



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**“Clonaje y expresión del gen de la exoproteasa pt4 de  
*Pseudomonas aeruginosa* M211”**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

**AUTOR**

Marijuly Sayuri KINA YSA

**ASESOR**

Dra. Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Kina M. Clonaje y expresión del gen de la exoproteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2020.

---

## Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5163-3770">https://orcid.org/0000-0001-5163-3770</a>
DNI o pasaporte del autor	70431374
Código ORCID del asesor	0000 0003 3844 7185
DNI o pasaporte del asesor	17880045
Grupo de investigación	"Biotecnología Microbiana y Salud" - BIOMIAS
Agencia financiadora	<p>El Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) a través de CIENCIACTICA, mediante el Convenio de Financiamiento N° 007 - FONDECYT - 2014</p> <p>El Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) a través del Contrato 040-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA</p>
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Laboratorio de Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional Mayor de San Marcos 12.0558° S, 77.0236° W</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2016 - 2019
Disciplinas OCDE	<p>Tecnologías de bioprocesamiento, Biotatálisis, Fermentación <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02</a></p> <p>Bioteconología agrícola, Bioteconología alimentaria <a href="http://purl.org/perepo/ocde/ford#4.04.01">http://purl.org/perepo/ocde/ford#4.04.01</a></p> <p>Tecnología de modificación genética <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.02">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.02</a></p>

Nota: tomar en cuenta la forma de llenado según las precisiones señaladas en la web (las tablas OCDE están incluidas).  
[https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion\\_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios\\_30junio.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios_30junio.pdf)



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Unidad de Posgrado**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR**  
**AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las **09:00 hrs. del 30 de junio de 2020** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga y Mg. Acela Inés Arnao Salas; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"CLONAJE Y EXPRESIÓN DEL GEN DE LA EXOPROTEASA PT4 DE *Pseudomonas aeruginosa* M2II"**, presentado por la Bachiller en Microbiología y Parasitología **MARIJULY SAYURI KINA YSA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

**19 (Diecinueve) EXCELENTE**

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Microbiología y Parasitología **MARIJULY SAYURI KINA YSA**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología**.

Siendo las **11:00** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **11:30** hrs. del 30 de junio de 2020.

Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda (P.P., D.E.)  
Presidenta

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P. P., T.C.)  
Miembro - Asesora

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Asoc. D.E.)  
Miembro

Mg. Acela Inés Arnao Salas  
Miembro

**Observaciones:**

*A Chiyoko Noguni Noguni ちよこ野國, mi Obachita,  
por enseñarme con amor los valores del esfuerzo,  
responsabilidad, integridad, perseverancia,  
respeto, lealtad, y gratitud.*

*A María Ysa Noguni y Masanori Kina Kina,  
por su amor y apoyo incondicional.  
Todas las metas y objetivos que he cumplido,  
son gracias a ustedes.*

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que durante estos años de trabajo me han apoyado y colaborado en el desarrollo de esta tesis. No obstante, en muchos casos quedará muy escueto poderles expresar todo el agradecimiento que merecen en unas pocas líneas.

A mi *alma mater*, la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos** por todo lo aprendido en sus aulas desde el 2007.

A mi asesora de tesis, **Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes**, por su valiosa asesoría y paciencia en enseñarme las técnicas de biología molecular, por motivarme a seguir investigando con pasión y dedicación, por la confianza depositada en mí desde el inicio y en todo momento y por darme la oportunidad de ingresar al Laboratorio de Biología Molecular y formar parte de la familia BIOMIAS.

A la **Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga**, por su amistad, generosidad, confianza, consejos personales y profesionales y sus aportes en el desarrollo de la tesis.

A **Juan Carlos Flores Santos, Carol Nathali Flores Fernández, Adrian Arturo Intiquilla Quispe y Pedro Eduardo Romero**, por ser mis amigos y por sus aportes en el desarrollo de esta tesis.

Al equipo de investigación **BIOMIAS** y a los integrantes del **Laboratorio de Biología Molecular**, especialmente a **Mg. Inés Arnao Salas, Dr. Carlos Vegas, Mg. Carmen Peña, Mg. Elizabeth Chávez, Omar, Olga, Susana, Leon, Camila, Karen, Pamela, José Manuel, Karina, Manuel y Cleni** por su amistad y apoyo durante estos años de desarrollo de la tesis.

A mis amigos **Maguita, Marisela, Mirko, Stephy, Abad, Johanna, Gina, Arturito, Tulin, Zorys y Anthony** por su cariño y buena energía.

A mis compañeros de la promoción ingresantes 2016 de la Maestría en Biotecnología **Margot, Tulio, Arturo, Zorys, Anthony, Janet, William, Christian, Nery, Nataly y Shamila**.

A los profesores de la Maestría en Biotecnología, por su generosidad en compartir sus conocimientos y experiencias.

A los docentes Miembros del Jurado Examinador y Calificador, por sus importantes sugerencias para la mejor redacción final de la tesis.

El presente trabajo fue parcialmente financiado por:

El Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica  
(CONCYTEC) a través de CIENCIACTICA, mediante el  
Convenio de Financiamiento N° 007 - FONDECYT - 2014

El Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) a través del  
Contrato 040-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA



## ÍNDICE

	Página
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	1
1.3. Justificación	1
1.3.1. Justificación teórica	1
1.3.2. Justificación práctica	2
1.4. Objetivos	2
1.4.1. Objetivo general	2
1.4.2. Objetivos específicos	2
 <b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>	 3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos teóricos	7
2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.2.2. Importancia de las proteasas en la industria	8
2.2.3. Clasificación general de las proteasas	9
a) De acuerdo al tipo de reacción que catalizan	9
b) De acuerdo al grupo funcional presente en el sitio activo	9
c) De acuerdo a las condiciones de su reacción	11
2.2.4. Elastasa EC 3.4.24.26 (BRENDA)	12
2.2.5. Tecnología de ADN recombinante	13
2.2.6. Clonación molecular	14
2.2.7. <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	21
2.2.8. Vector pJET1,2/blunt	22
 <b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b>	 25
3.1. Tipo y diseño de investigación	25
3.2. Microorganismos y condiciones de cultivo	26

3.3. Extracción del ADN genómico	25
3.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	26
3.5. Amplificación de los genes de exoproteasas	26
3.6. Secuenciamiento y análisis de genes de proteasas	26
3.7. Clonamiento	27
3.7.1. Ligación del producto de PCR al vector pJET1.2/blunt	27
3.7.2. Obtención de células competentes	28
3.7.3. Transformación	29
3.7.4. Verificación de la presencia del inserto	29
3.7.4.1. Extracción de plásmidos por lisis alcalina	29
3.7.4.2. Purificación de plásmidos por Cyclo-Prep™ Plasmid DNA Purification Kit (AMRESCO).	30
3.7.4.3. Digestión con enzimas de restricción	30
3.7.4.4. PCR del ADN recombinante	31
3.8. Criopreservación	31
3.9. Expresión de la proteasa PT4 recombinante	31
3.10. Caracterización parcial <i>in silico</i> de exoproteasa PT4 recombinante	32
3.10.1. Análisis <i>in silico</i> de la estructura primaria de la exoproteasa PT4 recombinante	32
3.10.2. Análisis <i>in silico</i> de la estructura secundaria y terciaria de exoproteasa PT4 recombinante	33
3.11. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ - pPT4	33
3.12. Inducción de la expresión de exoproteasa PT4	34
3.13. Ensayo de la actividad proteolítica	34
3.14. Caracterización parcial de exoproteasa PT4 <i>in vitro</i>	35
3.14.1. Cuantificación de proteínas solubles mediante método Bradford	35
3.14.2. Determinación de actividad enzimática de exoproteasa PT4 en geles de poliacrilamida	36
3.14.3. Efecto del pH en la actividad proteolítica de la exoproteasa PT4 recombinante	36

3.14.4. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de la exoproteasa PT4 recombinante	37
3.14.5. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la proteasa PT4 recombinante	37
3.14.6. Efecto de los inhibidores en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante	37
3.14.7. Efecto de iones metálicos en la actividad de exoproteasa PT4 recombinante	38
3.15. Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas	38
3.15.1. Extracción de proteínas hidrosolubles de semillas de leguminosas mediante precipitación isoelectrica	38
3.15.2. Hidrólisis enzimática de proteínas solubles de leguminosas	39
3.15.3. Separación de hidrolizados proteicos de leguminosas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	40
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS</b>	41
4.1. Extracción del ADN genómico total	41
4.2. Amplificación de genes de exoproteasas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211	42
4.3. Análisis de las secuencias de los genes de exoproteasa amplificados	42
4.4. Clonaje del gen proteasa PT4	43
4.4.1. Extracción de plásmidos por lisis alcalina	43
4.4.2. Purificación de plásmidos por kit comercial	44
4.4.3. Digestión con enzimas <i>Bgl</i> II	45
4.4.4. PCR del plásmido pJET1,2-PT4	45
4.4.5. Expresión de la proteasa PT4 recombinante	46
4.5. Caracterización parcial <i>in silico</i> de exoproteasa PT4 recombinante	47
4.5.1. Estructura primaria de la proteasa PT4 recombinante	47
4.5.2. Análisis <i>in silico</i> de las estructuras secundaria y terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante	50

4.6. Producción de proteasa PT4 recombinante	55
4.6.1. Inducción de la expresión del gen PT4 en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ - pPT4.	56
4.6.2. Ensayo de la actividad proteolítica	56
4.7. Caracterización parcial <i>in vitro</i> de exoproteasa PT4 recombinante	56
4.7.1. Cuantificación de proteínas solubles	56
4.7.2. Determinación de actividad de exoproteasa PT4 por zimografía	57
4.7.3. Efecto del pH y temperatura en la actividad proteolítica de la exoproteasa recombinante PT4	58
4.7.4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la exoproteasa PT4 recombinante	58
4.7.5. Efecto de los inhibidores en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante	59
4.7.6. Efecto de iones metálicos en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante	59
4.7.7. Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas	61
4.7.7.1. Extracción de proteínas solubles de las semillas de leguminosas	61
4.7.7.2. Hidrólisis enzimática del concentrado proteico de leguminosas	61
4.7.7.3. Separación de hidrolizados proteicos de leguminosas mediante electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE)	61
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN</b>	63
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES</b>	73
<b>CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	74

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Elementos genéticos del vector de clonación pJET1,2	24
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de los primers	24
<b>Tabla 3.</b> Características de los primers utilizados en la amplificación de genes de exoproteasas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211	27
<b>Tabla 4.</b> Componentes de la reacción para generar extremos romos en el producto de PCR	28
<b>Tabla 5.</b> Componentes de la reacción de ligación del inserto con el vector.	28
<b>Tabla 6.</b> Componentes de transformación	29
<b>Tabla 7.</b> Inhibidores utilizados con la exoproteasa PT4 recombinante.	37
<b>Tabla 8.</b> Composición aminoacídica de la región madura de la exoproteasa PT4 recombinante.	51
<b>Tabla 9.</b> Actividad enzimática de exoproteasa PT4 recombinante producido por <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ – pPT4.	56
<b>Tabla 10.</b> Efecto de los inhibidores en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211.	60
<b>Tabla 11.</b> Efecto de iones metálicos en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211.	60
<b>Tabla 12.</b> Proteínas residuales de leguminosas después de la hidrólisis con exoproteasa PT4 recombinante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211.	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la estructura de preproelastasa.	13
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa	17
<b>Figura 3.</b> Copia exponencial de un gen de interés durante la reacción en cadena de la polimerasa	18
<b>Figura 4.</b> Etapas del clonaje	19
<b>Figura 5.</b> Esquema de electroforesis en gel de agarosa.	21
<b>Figura 6.</b> Mapa del vector pJET1.2	23
<b>Figura 7.</b> Secuencia de ADN de la región del clonaje múltiple	23
<b>Figura 8.</b> Ácidos nucleicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211 en gel de agarosa al 1 %.	41
<b>Figura 9.</b> Productos de exoproteasas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211 amplificados por PCR separados por electroforesis en gel de agarosa 1%. Carriles: MP, marcador de peso molecular de 100 pb; 1, primers PF1 y PR2; 2, primers PF3 y PR4; 3 primers PF5 y PR6; 4 primers PF7 y PR8.	42
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa al 1% conteniendo plásmidos recombinantes. A) lisis alcalina, (b) purificados por kit comercial. Carriles: 1-3, plásmido pJET 1,2- PT4; 4, plásmido pJET 1,2; MP, marcador de peso molecular de 100 pb.	45
<b>Figura 11.</b> Gel de agarosa 1% con los productos de la digestión con Bgl II del plásmido pJET1,2 - PT4. Carriles: 1, 2 y 3 pJET1,2; 4, pJET1,2; MP, marcador de peso molecular de 100 bp.	45
<b>Figura 12.</b> Hidrólisis proteica por exoproteasa PT4 de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ – pPT4 con y sin inducción por IPTG. (a) skim milk; (b) gelatina.	46
<b>Figura 13.</b> Péptido señal de exoproteasa PT4. El recuadro con aminoácidos 23 y 24 indica el punto de corte probable.	48
<b>Figura 14.</b> Secuencia nucleotídica del gen exoproteasa PT4 de <i>Pseudomonas</i>	49

*aeruginosa* M211

<b>Figura 15.</b>	Estructura terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante obtenida de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M211	52
<b>Figura 16.</b>	Estructura terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante, donde se muestran los dominios C-terminal en azul y N-terminal en fucsia.	52
<b>Figura 17.</b>	Dominios C-terminal y N-terminal de la exoproteasa PT4 recombinante.	53
<b>Figura 18.</b>	Residuos aminoacídicos de unión a zinc de la exoproteasa PT4 recombinante.	54
<b>Figura 19.</b>	Residuos aminoacídicos de unión a calcio de la exoproteasa PT4 recombinante.	54
<b>Figura 20.</b>	Residuos aminoacídicos que conforman el sitio activo de exoproteasa PT4 recombinante.	55
<b>Figura 21.</b>	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ - pPT4.	55
<b>Figura 22.</b>	Curva patrón de proteínas	57
<b>Figura 23.</b>	Zimografía de la exoproteasa PT4 recombinante. M, marcador de peso molecular.	57
<b>Figura 24.</b>	Óptimos de pH y temperatura de la actividad de exoproteasa PT4 recombinante.	58
<b>Figura 25.</b>	Estabilidad térmica de la exoproteasa PT4 recombinante.	59
<b>Figura 26.</b>	SDS-PAGE de los hidrolizados proteicos de leguminosas con exoproteasa PT4 recombinante. (a) <i>Lupinus mutabilis</i> , (b) <i>Phaseolus lunatus</i> y (c) <i>Erythrina edulis</i> . MP, marcador de peso molecular, P: concentrado proteico; exoproteasa PT4 recombinante, A: Alcalasa®.	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

pb	pares de bases
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
aa	aminoácido
PCR	cadena de reacción de la polimerasa
CP	concentrado proteico
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético
E-64	<i>trans</i> -epoxisuccinil-L-leucolamido (4-guanidino) butano
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenilmetilsulfonil fluoruro).
BSA	Albúmina de sérico bovina
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ – pPT4	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ que contiene el plásmido pJET1,2-PT4
pJET1,2-PT4	Plásmido recombinante que contiene el gen de la exoproteasa PT4
<i>Bgl</i> II	Endonucleasa de restricción de tipo II aislada de <i>Bacillus globigii</i> .
TBE	tris-borato-EDTA
SDS	dodecilsulfato sódico
CCC	circulares cerrados covalentemente
LB	Luria-Bertani
kDa	kilodalton



## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* produce proteasas extracelulares con gran potencial industrial, sin embargo, su uso se limita por ser un patógeno oportunista. En consecuencia, el clonaje génico en un hospedero reconocido como seguro permite aprovechar la capacidad catalítica de sus enzimas. Por ello, en esta investigación se realizó el clonaje, expresión y caracterización parcial de la exoproteasa PT4 de *P. aeruginosa* M211, con la finalidad de contar con un insumo catalítico para su uso en las industrias alimentaria, farmacéutica, médica, pecuaria, química, entre otros. En la primera etapa se seleccionaron cebadores de diferentes exoproteasas de *P. aeruginosa*, después se amplificaron los genes por la reacción en cadena de la polimerasa. En seguida, el gen de la exoproteasa PT4 se unió al vector pJET 1,2 usando *E. coli* DH5α como hospedero. El análisis de la secuencia nucleotídica parcial de la proteasa indicó un 99% de similitud con Peptidasas de la Familia M4 de *P. aeruginosa*. La exoproteasa PT4 recombinante, presenta sus óptimos de pH y temperatura a 8 y 60 °C, respectivamente, fue inhibida por ácido etilendiaminotetracético y zinc 10 mM; pertenece al grupo de metaloproteasas. Finalmente, la exoproteasa PT4 recombinante se utilizó en la hidrólisis de concentrados proteicos de *Lupinus mutabilis*, *Phaseolus lunatus*, y *Erythrina edulis* mostrando mayor porcentaje de hidrólisis en los dos últimos. Por lo tanto, esta proteasa recombinante presenta gran potencial prospectivo para la hidrólisis de proteínas de fuentes vegetales y animales y en residuos agroindustriales, pecuarios, pesqueros, entre otros.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*; clonaje génico; exoproteasa; leguminosas; hidrolizados proteicos.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen causing various infectious diseases. Some of the virulence factors that allow it to invade its host are exoproteases with great industrial potential. However, being a pathogen prevents its use in the food industry. In this aspect, gene cloning in an authorized host "GRAS" (generally recognized as safe) allows to take advantage of the catalytic capacity of exoprotease. Therefore, in this investigation the cloning, expression and partial characterization of the PT4 protease of *Pseudomonas aeruginosa* M211 was carried out, with the purpose of having a catalytic input for use in the food, pharmaceutical, medical, fur, textile, chemical industries, among others. In the first stage, primers of different *Pseudomonas aeruginosa* exoproteases were selected, and then the genes were amplified by the polymerase chain reaction. Next, the PT4 protease gene was linked to the pJET 1,2 vector using *E. coli* DH5 $\alpha$  as a host. The analysis of the partial nucleotide sequence of the protease indicated a 99% similarity with Peptidases of the M4 Family of *Pseudomonas aeruginosa*. The recombinant PT4 exoprotease has its optimum pH and temperature at 8 and 60 ° C, respectively. This exoprotease was inhibited by EDTA, which indicates that it belongs to the metalloprotease group. Once characterized, hydrolysis of protein concentrates of *Lupinus mutabilis*, *Phaseolus lunatus*, and *Erythrina edulis* was performed, resulting in peptide fractions smaller than 40 kDa. Therefore, this recombinant protease has great potential in that of functional protein hydrolysates from proteins from different sources and agro-food residues.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; gene cloning; exoprotease; legumes; protein hydrolysates

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Situación problemática**

Actualmente, se prefieren los procesos industriales que generen menor impacto a la naturaleza, en vez de los químicos que alteran el ambiente. Una alternativa verde y sostenible, es el uso de sistemas biológicos o derivados de estos para la obtención de productos a partir de materias primas de desecho, aportando así beneficios económicos y ambientales (1) (2). En este contexto, el uso de enzimas reduce la contaminación, aumentan la velocidad de reacción y en muchos casos soportan condiciones adversas (1). De las enzimas usadas en la industria, las proteasas, principalmente las de origen microbiano, son el grupo más importante en el mercado por su aplicación en las industrias de alimentos, detergentes, farmacéutica, textil, peletera, entre otras (1) (2) (3). En concordancia a la gran demanda del mercado, se busca nuevas proteasas con características peculiares, como estabilidad a amplios rangos de pH y temperatura y capacidad de hidrolizar diferentes fuentes proteicas. Asimismo, la propensión de aplicar tecnologías eco-amigables está en aumento, en consecuencia, las enzimas proteolíticas son una opción para los procesos biotecnológicos, coadyuvando a reducir la polución y dando un valor agregado a los subproductos agroindustriales y pecuarios como tortas de semillas oleaginosas, plumas, pelos, entre otros.

### **1.2. Formulación del problema**

¿Será posible el clonaje y la expresión de un gen de exoproteasa de *Pseudomonas aeruginosa* M211?

### **1.3. Justificación de la investigación**

#### **1.3.1. Justificación teórica**

Se calcula que el mercado mundial de proteasas representa el 60% del total de enzimas comercializadas (4). Por ello, constantemente se buscan nuevas fuentes de enzimas proteolíticas con potencial industrial. En este contexto, Perú presenta numerosos ambientes naturales de condiciones de vida versátil, donde las poblaciones de microorganismos nativos muestran potencial biotecnológico atractivo.

### **1.3.2. Justificación práctica**

*Pseudomonas aeruginosa* M211, produce proteasas con gran potencial en la industria biotecnológica por presentar estabilidad a grandes rangos de temperatura, pH, alta actividad proteolítica, con capacidad de hidrolizar proteínas de diversas fuentes como lactosuero, saguaza, tortas de semillas oleaginosas, plumas, pelos, etc.(5)(6); colaborando en aminorar la contaminación ambiental. Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* es reconocida como un patógeno oportunista, causante de infecciones como queratitis, neumonía aguda, entre otras. En consecuencia, no se puede usar la bacteria de forma directa en las industrias alimentaria, farmacéutica o cosmética por los factores de virulencia que presenta. Por ello es necesario clonar los genes que codifican las proteasas de interés en un huésped seguro para su aprovechamiento en la industria. Los sistemas de expresión heterólogos se utilizan para producir enzimas recombinantes con mayor rendimiento, lo cual conlleva a un proceso tecnológico rentable y sostenible, superando así, las limitaciones relacionadas con la fuente nativa. Por lo expuesto, es necesario clonar y expresar los genes de exoproteasas para su mejor aprovechamiento.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

- Clonar y expresar el gen de la exoproteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Seleccionar cebadores específicos para amplificar y clonar el gen de la exoproteasa de *Pseudomonas aeruginosa* M211 en *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- Producir la exoproteasa PT4 recombinante en *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- Caracterizar parcialmente la exoproteasa PT4 recombinante mediante estudios *in silico* y bioquímicos.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Alejando-Paredes et. al (5), reportan la optimización de un medio de cultivo para la producción de proteasas extracelulares de *Pseudomonas* sp. M211 aislada de Tambopata, Madre de Dios. Para ello, primero realizaron el estudio de un factor a la vez, el cual consistió en el análisis de 21 componentes entre ellos iones, fuentes de carbono y nitrógeno; y la selección de los factores que influyen en la producción de proteasas de modo autónomo. Después, utilizan los factores que produjeron un efecto positivo en el estudio de un factor a la vez, planteando un diseño de Plackett - Burman (PB), el cual determina los factores que actúan en un sistema multivariable de manera significativa en la producción de las proteasas. Analizando 10 factores y realizando 33 experimentos concluyen que las fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura y la peptona influyen en la producción de proteasas para esta cepa bacteriana.

Flores-Fernández et. al (6), describen proteasas extremófilas de *Pseudomonas aeruginosa* M211 y su aplicación en la hidrólisis de proteínas solubles de los granos secos del destilado (DDGS). Por ello purificaron y caracterizaron tres proteasas producidas por *P. aeruginosa* M211, aislada de la Amazonía peruana. Las tres son serina proteasas alcalinas y termofílicas denominadas EI, EII y EIII con un peso molecular de 35, 40 y 55 kDa, respectivamente. EI y EIII fueron fuertemente inhibidas por EDTA y Pefabloc, clasificadas como serina-metaloproteasas, mientras que EII se inhibió completamente solo con Pefabloc considerada como serina proteasa. La actividad enzimática óptima fue 60 °C y pH 8 para EI y EII y a pH 11 para EIII. La actividad de EI fue fuertemente estimulada en presencia de  $Mn^{2+}$  (6,9 veces), EII por  $Mn^{2+}$  (3,7 veces), mientras que EIII fue ligeramente estimulada por  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Asimismo, probaron la capacidad de hidrolizar las proteínas solubles de DDGS, basándose en la liberación de glicina, EIII presentó la mayor actividad proteolítica sobre estos sustratos. Esta enzima permitió la liberación del 63% del contenido total de glicina en la proteína DDGS de trigo, 2,2 veces mayor que cuando se usa Pronase® comercial. Por lo tanto, estas proteasas de *P. aeruginosa* M211 tienen potencial para su aplicación en la hidrólisis de DDGS.

Al-Rubii (7) amplificó el gen LasB que codifica la elastasa y lo insertó en el plásmido pGEX-KG para expresarlo en *E. coli*. Asimismo, determinó el efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* que contiene elastasa cruda en monocapa de la línea celular Vero. El vector de expresión recombinante pGEX KG-LasB, fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) y en *E. coli* DH5 $\alpha$  y cultivado en caldo LB con 100  $\mu$ g/ml ampicilina e incubado a 37 °C toda la noche a 200-250 rpm. La expresión se indujo mediante la adición de 1  $\mu$ l/ml de (IPTG 1 mM). Las células se cosecharon a 1, 2, 4 y 6 h. La *E. coli* BL21(DE3) recombinante inducida con IPTG, no expresó la elastasa, ni en sobrenadante ni dentro de la célula, mientras que la *E. coli* DH5 $\alpha$  luego de la inducción se observó una expresión débil hasta después de 6 h de estimulación y se detectó como una banda ligera en SDS-PAGE con un peso molecular de aproximadamente 50 - 55 kDa. Este peso molecular, probablemente puede atribuirse a la expresión de una nueva proteína de 33 kDa fusionada con 26 kDa de la proteína GST (gen del vector de expresión, el cual sirve como un marcador de purificación). Por otro lado, se determinó que el sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* contenía elastasa la cual se investigó contra la línea celular Vero y se observó desprendimiento y cambio de morfología de forma de huso a células redondas, estos cambios fueron seguidos por la destrucción gradual y la actividad citotóxica en las células monocapa y luego se dañaron después de 96 h causando la muerte celular. La destrucción de las células Vero se debería a la capacidad de la elastasa de desintegrar la matriz extracelular: colágenos, laminina, fibronectina, proteoglicanos, elastina, etc.

Derek Draper (8) clonó y expresó la elastasa de *P. aeruginosa* para dilucidar el efecto fisiopatológico sobre el tejido pulmonar. Para ello amplificó el gen lasB y clonó en el vector pET28b y en *E. coli* 10G, posteriormente para la expresión fue transformado en ClearColi BL21. Las células se indujeron con IPTG y posteriormente fueron sonicadas y centrifugadas. El sobrenadante se le realizó cromatografía líquida de Ni-NTA y purificación por FPLC. Análisis SDS-PAGE de las fracciones de cromatografía Ni-NTA de elastasa recombinante: el gel muestra la proteína madura (34 kDa) y proelastasa (55 kDa) con varios fragmentos más pequeños (aprox.17 kDa). *P. aeruginosa* produce a la elastasa como una pro-proteína de 55 kDa antes de ser escindida y posteriormente activada a proteína madura de 33 kDa, con pérdida de un fragmento de 22 kDa. Por lo tanto, la

presencia de las dos proteínas indica proelastasa y elastasa más los fragmentos de su escisión. La actividad proteolítica fue determinada mediante un halo de hidrólisis en agar skim milk. En el sustrato elastina - rojo de congo, la actividad elastolítica fue dos veces la actividad de la enzima comercial. La elastasa de esta bacteria es capaz de alterar el complejo de unión mediante la manipulación de la proteína ZO-1. En monocapas de células normales, las uniones estrechas se encuentran uniformemente en la periferia. Sin embargo, con la adición de elastasa recombinante, la proteína ZO-1 se fragmenta en su expresión. Los estudios *in vivo* confirmarán el impacto de alteraciones inducidas por la elastasa recombinante en el complejo de unión en condiciones patológicas que incluyen edema pulmonar.

Zhu, et. al (9) clonaron y expresaron el gen LasB que codifica una metaloproteasa resistente a solventes de *P. aeruginosa* PT121 y la aplicaron en la síntesis de péptidos. Construyeron el plásmido pET22b - lasB y lo expresaron en *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de la proteasa no fue extracelular, por ello realizaron la lisis celular con lisozima, y la actividad específica fue 7700 U / mg. Así, la PAGE mostro una banda de 33 kDa. La proteasa recombinante fue estable entre 30 a 60 °C durante 1 h, pero disminuyó a 70 °C. Además, la proteasa PT121 fue estable a pH entre 6,0 y 11,0 durante 1 h e incluso a pH 5,0 presento 70 % de su actividad inicial. Asimismo, presentó estabilidad en varios solventes orgánicos, especialmente en DMSO 50 % y alcohol isoamílico 50 %, el tiempo de vida media fue 100 d. La estabilidad fue menor en acetonitrilo 25 % y acetona 50 %. Las propiedades obtenidas fueron similares a las de la proteasa nativa PT121. Se utilizaron en la síntesis de varios dipéptidos utilizando PT121 recombinante en un sistema DMSO 50 %. Los rendimientos de dipéptidos como el precursor de aspartamo (Z-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>), Z-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> y Z-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> fueron superiores al 90 %. La heteroexpresión de la proteasa PT121 permite el estudio de los mecanismos de catálisis y evolución molecular.

Andrejko et. al (10) evaluaron *P. aeruginosa* ATCC 27853 y dos aislados clínicos, estas cepas fueron cultivadas en medio mínimo M9 y en caldo Luria-Bertani (LB), midieron la actividad proteolítica y realizaron zimogramas. Asimismo, observaron que *P. aeruginosa* ATCC 27853 produjo tres enzimas proteolíticas en el medio LB: proteasa IV, elastasa B y

elastasa A, mientras que la proteasa alcalina solo se produjo en el medio M9. Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* produjeron elastasa B y proteasa alcalina cuando crecieron en el medio LB y el medio mínimo M9, respectivamente. La presencia del gen LasB (elastasa B) y aprA (proteasa alcalina) fue determinado en las tres cepas evaluadas mediante PCR. La expresión de estos genes depende de las condiciones y componentes del medio de cultivo.

Raftari et. al (11) sobreexpresaron la elastasa extracelular de *P. aeruginosa* en *E. coli* y caracterizaron la enzima purificada. El gen lasB midió 1497 pb, fue clonado en el vector pCR-Blunt en *E. coli* TOP 10 y se expresó en pET32a transformada en *E. coli* BL21. *E. coli* BL21 recombinante fue cultivada en caldo LB con 100 µg/ml de ampicilina e inducido con IPTG 1 mM. Mediante técnicas de Western blot se determinó un peso de 53 kDa. La actividad elastasa de *E. coli* recombinante, fue de 670 µg ml<sup>-1</sup> y la específica de 195 U/ml aproximadamente 38 veces mayor que la nativa.

Ghorbel-Bellaaj et. al (12) purificaron y caracterizaron una proteasa extracelular de *P. aeruginosa* A2 cultivada en un medio conteniendo cáscara de camarón en polvo como fuente única de nutrientes. Después, purificaron la enzima mediante ultrafiltración, en Sephadex G-100 y cromatografía de intercambio aniónico Sepharose Mono Q, con un aumento de 2,23 veces en la actividad específica y una recuperación del 64,3%, el peso molecular fue 34 kDa. Los óptimos de temperatura y el pH fueron 60 °C y 8,0. Asimismo, el EDTA inhibió la actividad lo cual indica que es una metaloproteasa, esta enzima fue estable a dietil éter y DMSO. La proteasa permitió la desproteinización de residuos de camarones para su posterior uso en la obtención de quitina. El porcentaje de eliminación de proteínas después de 3 h de incubación a 40 °C con una relación enzima/sustrato de 5 U/mg de proteína fue aproximadamente del 75%. Por otro lado, la elastasa demostró capacidad depilatoria de la piel bovina.

Thayer et. al (13) cristalizaron y elucidaron por primera vez la estructura tridimensional de la elastasa de *P. aeruginosa* (PAE) utilizando datos a una resolución de 1,5- Å y elucidaron la estructura molecular nativa a R = 0,188. La PAE es una metaloproteasa de Zn con 301



aminoácidos. En la elucidación de la estructura terciaria utilizaron a la termolisina de *Bacillus* sp. como molde, en este aspecto, la estructura de PAE es similar a la de termolisina, con la cual comparte el 28% de identidad de secuencia aminoacídica. La mayoría de los residuos del sitio activo podrían interactuar con sustratos idénticos en las dos proteínas; pero la hendidura es más "abierta" en PAE que en termolisina; también identificaron que los residuos de unión al Zn fueron similares. Sin embargo, la diferencia es la presencia de dos puentes disulfuros en PAE (Cys-30-Cys-58 y Cys-270-Cys-297).

Gupta et. al (14) realizaron la identificación, la caracterización molecular y el análisis filogenético del gen *PseA* de *P. aeruginosa* tolerante a solventes orgánicos. La secuencia N-terminal de la proteasa purificada de *P. aeruginosa* reveló similitud con el gen *lasB* de *P. aeruginosa* PST-01. La secuencia del DNAC se usó para el diseño de cebadores y amplificación y clonaje de un producto de 1,494 pb en "pGEM-T Easy vector" y transformado en *Escherichia coli* XL-1 Blue MRF'. El ORF de 1,494 pb del gen *PseA* codifica 498 aminoácidos, el cual codifica una proteína de 53,6 kDa. La proteína *LasB* contenía un péptido señal de 23 residuos (2,6 kDa) seguido por un propéptido de 174 residuos y un producto maduro de 301 residuos y 33 kDa. También, esta proteína contenía un motivo HEXXH conservado de fijación a zinc, característico de las metalopeptidasas. Además, se determinó que la proteasa contenía dos enlaces disulfuro (entre Cys-227 y Cys-255 y entre Cys-467 y Cys-494) y un número de grupos hidrofóbicos en la superficie de la proteína. Estos dominios hidrofóbicos (21% de la secuencia) y enlaces disulfuro podrían ser responsables de la estabilidad en solventes orgánicos.

## **2.2. Aspectos teóricos**

### **2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa***

Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, asporógeno, monoflagelado, ubicuo, clasificado como patógeno oportunista. Esta bacteria rara vez causa enfermedad en huéspedes sanos, pero afecta a pacientes con infecciones subyacentes o inmunocomprometidas.

*P. aeruginosa* puede infectar tracto urinario, pulmones, faringe, huesos, articulaciones, aparato gastrointestinal, tejidos blandos, oídos, ojos, sistema nervioso central, incluyendo infecciones de heridas, pioderma y dermatitis, infecciones del oído, oculares, del sistema nervioso central, gastrointestinales, respiratorias, endocarditis, bacteriemia y septicemia.

*Pseudomonas* coloniza los pulmones de los pacientes con fibrosis quística (FQ) y contribuye a la enfermedad pulmonar progresiva crónica y la alta tasa de mortalidad en estos pacientes (15) (16) (17). Personas con fibrosis quística, SIDA, quemaduras o ciertos cánceres están predispuestos a la infección por *P. aeruginosa* (18) (19).

La capacidad de *P. aeruginosa* para invadir tejidos depende de enzimas extracelulares y toxinas que rompen las barreras físicas y dañan las células huésped, así como también restos de superficie como el exopolisacárido y el lipopolisacárido que protegen al organismo de la opsonización por anticuerpos, la deposición del complemento, la envoltura del fagocitos (20).

Dos proteasas extracelulares que están asociadas con la virulencia ejercen su influencia en la etapa invasiva: elastasa y proteasa alcalina. Estas proteasas inactivan el interferón gamma (IFN), el factor de necrosis tumoral (TNF) y escinden IgG e IgA; dando como resultado, la inhibición de la respuesta inmune local que, a su vez, permite la creación de un entorno para la colonización y establecimiento de infección crónica. Estas proteasas destruyen la sustancia fundamental de la córnea y otras estructuras de soporte compuestas de elastina y fibrina. Además, *P. aeruginosa* produce otras tres proteínas solubles: una citotoxina, una fosfolipasa y una lecitinasa que le permiten formar poros y destruir lípidos y la lecitina (15) (20).

### **2.2.2. Importancia de las proteasas en la industria**

Algunos productos químicos afectan la salud de las personas y el ambiente. Por ello, se busca reemplazarlos con moléculas biodegradables para el bienestar de los seres en el planeta. En consecuencia, se viene reemplazando los procesos químicos por enzimáticos. Existe una variedad de enzimas, especialmente las proteasas microbianas, son las más utilizadas en las industrias de alimentos, farmacéutica, textiles, detergentes, cuero, piensos, desechos y otros.

Las proteasas son ubicuas, están en animales, vegetales, microorganismos. Las proteasas muestran especificidad y selectividad en la modificación de proteínas para generar pequeños péptidos y aminoácidos libres; representan el 60% de enzimas industriales. Las proteasas disponibles en el mercado son de origen microbiano debido a su fácil producción, alto rendimiento, menor tiempo y espacio, elevada manipulación genética y rentabilidad, propiedades adecuadas para su aplicación biotecnológica (2) (21) (22) (23) (24).

### **2.2.3. Clasificación general de las proteasas**

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se clasifican en el Grupo 3 (hidrolasas), subgrupo 4.

Por el contrario, debido a su gran diversidad de acción y estructura, no encajan fácilmente al sistema general de nomenclatura enzimática. En la actualidad, se clasifican según tres criterios: (a) tipo de reacción catalizada, (b) basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, (c) de acuerdo a las condiciones de reacción (2).

#### **a) De acuerdo al tipo de reacción que catalizan**

- **Exopeptidasas.** Ejercen su actividad cerca de los extremos de las cadenas de polipéptidos. Las carboxipeptidasas escinden el enlace peptídico del extremo C terminal y las aminopeptidasas escinden el enlace peptídico del extremo N terminal (25) (26) (2).
- **Endopeptidasas.** Actúan en los enlaces peptídicos de las regiones internas de la cadena polipeptídica, lejos de los extremos N y C terminal (25) (26)(2).

#### **b) De acuerdo al grupo funcional presente en el sitio activo**

- **Serina proteasas** (EC 3.4.21) son las más estudiadas y se caracterizan por presentar el grupo serina en su sitio activo. Todas las serina- proteasas contienen tres residuos en su sitio activo: serina, histidina y aspartato, lo que se conoce como la tríada catalítica. Otra característica es la conservación de residuos de glicina en la cercanía del residuo de serina catalítica. Generalmente, su actividad es mayor a pH neutro y alcalino. Las serina-proteasas son inhibidas irreversiblemente por

fenilmetilsulfonilofluoruro (PMSF), diisopropilfluorofosfato (DFP) y tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK). Dentro de este grupo, la más conocida es la subtilisina de *Bacillus sp.* (2) (27)

- **Aspartil proteasas** (EC 3.4.23) dependen de dos residuos de ácido aspártico altamente conservados para su actividad catalítica, presentan su máxima actividad a bajos valores de pH, entre 3 a 4, por ello son denominadas proteasas acidas. Tienen puntos isoeléctricos en el rango de pH 3,0 a 4,5. Estas proteasas son inhibidas por pepstatina (26) (2).
- **Cisteína proteasas** (EC 3.4.22) contienen el residuo cisteína en su sitio activo. La mayoría presenta su máxima actividad a pH neutro, dependen una díada catalítica que consiste en cisteína e histidina. El orden de los residuos de Cys e His (Cys-His o His-Cys) difiere entre las familias. En general, las cisteína-proteasas son activas en presencia de agentes reductores como HCN o cisteína, son susceptibles a los agentes sulfidrílo, como PCMB, pero no DFP ni agentes quelantes de metales, como EDTA. La papaína es la cisteín proteasa más ampliamente conocida (26) (2).
- **Metaloproteasas.** Requieren un ion metálico divalente para su actividad, son las más diversas de los tipos catalíticos de proteasas. Muestran su máxima actividad a pH neutro y alcalino. Contienen un zinc en su sitio activo, esencial para su actividad; y presentan un átomo de calcio en su estructura, el cual contribuye en la estabilidad de la estructura terciaria de la proteína. La mayor parte de metaloproteasas, contienen el motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), el cual forma una parte del sitio para la unión del metal, generalmente zinc. Para los que se encuentran en estado nativo y son dependientes de Zn, el ion está coordinado tetraédricamente unido a la histidina 142, la histidina 146, el ácido glutámico 166 y la molécula de agua. Este último es común a todas las metaloproteínas de Zn. Después de unirse la proteína, el Zn está pentacoordinado. Al mismo tiempo, la molécula de agua se aproxima al glutamato 143 y se polariza fuertemente. Como resultado, la nucleofilicidad de la molécula de agua se hace suficientemente grande para atacar el enlace peptídico. El ataque

nucleofílico en el enlace peptídico tiene lugar, en cuyo caso un protón del agua es transferido al nitrógeno a través del glutamato 143. El carbono del enlace peptídico es ahora tetraédrico. La histidina 231 y la tirosina 157 ayudan a estabilizar el oxígeno del carbonilo. Finalmente, se da la escisión del enlace peptídico, el segundo protón acuoso se transfiere a través del glutamato 143 al átomo de nitrógeno. El producto de amina sale del centro activo como una forma protonada. El producto carboxilo se sustituye por una nueva molécula de agua de manera que el átomo de Zn se coordine de nuevo tetraédricamente y empiece un nuevo mecanismo de reacción. Las metaloproteasas, incluyen enzimas de diversos orígenes, como colagenasas de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de venenos de serpiente y termolisina de bacterias. Las más ampliamente estudiadas han sido la termolisina producida por *Bacillus sp.* y la elastasa producida por *P. aeruginosa* (26) (2) (28).

**c) De acuerdo a las condiciones de su reacción**

- **Proteasas ácidas.** Exhiben actividad y estabilidad máximas en condiciones ácidas (pH 2,0 - 5,0) y se inactiva a valores de pH superiores a 6,0. En este grupo se encuentra la mayoría de aspartil proteasas y algunas cisteína y metaloproteasas (29). Dos tipos son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos y bebidas: la de *Aspergillus*, que se parecen a la pepsina; y las de *Mucor*, a la renina (30). Las proteasas ácidas son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos, bebidas y farmacéutica (31). La principal aplicación de estas enzimas es la producción de queso en la industria láctea. Las proteasas microbianas coagulantes de la leche pertenecen a los aspartil proteasas ácidas y tienen pesos moleculares entre 30,000 y 40,000 Dalton (2). Además son utilizados en la degradación de la turbidez en zumos de frutas y licores (32).
- **Proteasas neutras** actúan en un ambiente neutro, ligeramente ácido o alcalino. Su pH óptimo está entre 6,0 y 7,5; presentan baja estabilidad térmica y especificidad por aminoácidos hidrofóbicos. Las proteasas neutras se aplican ampliamente en las industrias alimentaria (33) (34), farmacéutica (35) y peletera, debido a sus excelentes características catalíticas, incluido un proceso suave, bajo nivel de contaminación y alto rendimiento. En la industria alimentaria, la proteasa neutra se

usa para desamargar la salsa de soja (36) y elaboración de cerveza (37). La más estudiada es la Neutrasa (26).

- **Proteasas alcalinas.** La mayoría de estas proteasas alcalinas son serina proteasas o metaloproteasas, y muestran un pH óptimo alrededor de 8 - 12 y una temperatura óptima alrededor de 40 a 65 °C. Al ser activas desde pH neutro a alcalino, las hace muy deseadas en industrias como la fabricación de detergentes, la producción de alimentos y piensos, la síntesis de péptidos, el procesamiento de cuero, la fotografía, el desgomado de seda y el manejo de desechos. Representan aproximadamente una cuarta parte de las ventas totales de enzimas a nivel mundial (38). El género *Bacillus* es el principal productor de proteasas alcalinas a nivel comercial (24), aunque también se han obtenido de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Vibrio*; y en hongos como *Aspergillus* (39).

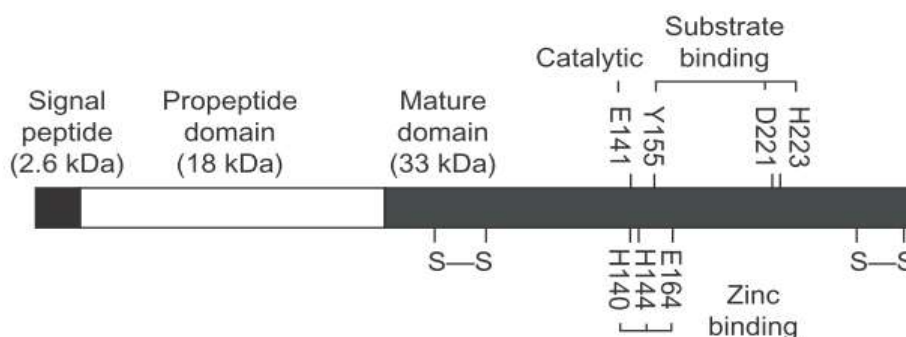
#### **2.2.4. Elastasa EC 3.4.24.26 (BRENDA)**

La elastasa es una metaloendopeptidasa dependiente de zinc cuyo peso molecular es 33 kDa, está estrechamente relacionada con la termolisina (40) (41). Esta enzima es codificada por el gen *lasB*, sintetizada como una preproenzima con 498 residuos aminoacídicos y una masa molecular de 53,6 kDa. Este precursor tiene un péptido señal de 2,6 kDa (23 residuos) seguido de un propéptido de 18 kDa (174 residuos) y el dominio maduro de 33 kDa (301 residuos) (Figura 1) (42) (41) (13) (43) (44). El péptido señal es eliminado al pasar a través de la membrana interna hacia el periplasma, donde el propéptido se separa rápidamente mediante autoproteólisis. Este paso es necesario para la secreción de elastasa porque una mutación en el sitio activo bloquea la secreción de elastasa, así como la actividad enzimática y el procesamiento (45). Después del autoprocesamiento, permanece asociado de forma no covalente con el dominio maduro para formar un complejo de propéptido-elastasa inactivo, y es en esta forma que se encuentra elastasa dentro del periplasma de *P. aeruginosa*. El propéptido también funciona como una chaperona intramolecular requerida para la competencia correcta de plegamiento y secreción (45). La región madura comparte una considerable homología de secuencia con la termolisina. Esta homología es especialmente pronunciada (48% de identidad) en la región entre los residuos 136 y 180,

incluida parte del sitio activo (43) (13). El nombre elastasa se refiere a la capacidad de la enzima para degradar la elastina (46).

El pH óptimo está entre 7 y 8, además requiere  $\text{Ca}^{+2}$  para la estabilidad de la estructura terciaria. La actividad enzimática es inhibida por quelantes de metales como EDTA, EGTA, 1,10-fenantrolina y tetraetilenpentamina y  $\text{Zn}^{+2}$  ( $\geq 0,01 \text{ mM}$ ) (40).

Contiene un átomo de zinc que es esencial para la actividad y uno de calcio para la estabilidad. Una secuencia HEXXH conservada en las posiciones 140 a 144 y un Glu164 conservado están implicados en la unión al zinc, siendo los ligandos de zinc His140, His144 y Glu164. Glu141 es esencial para la catálisis, mientras que Tyr155, His223 y aparentemente Asp221 están implicados en la unión del sustrato. El átomo de calcio está ligado por los grupos carboxilo de Glu172, Glu175, Asp136 y Asp183, el carbonilo de Leu185 y una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (13). Dos enlaces disulfuro, Cys30 Cys58 y Cys270 Cys297, también están presentes y son esenciales para la estabilidad y la actividad, respectivamente (47).



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de preproelastasa. (47).

### 2.2.5. Tecnología de ADN recombinante

Con el inicio de esta tecnología, se puede crear clones transgénicos, clones con genomas que contienen fragmentos de ADN de otros organismos, se define como la unión de dos o más moléculas de ADN de dos especies diferentes y que se insertan en un organismo huésped para producir una proteína o molécula de interés para diferentes procesos tecnológicos. Esta tecnología permite aislar un gen, determinar su secuencia, estudiar sus

transcripciones, mutarla de manera específica e introducirlo en un organismo para la síntesis de la proteína o molécula de interés.

La tecnología de ADN recombinante surgió con el descubrimiento de enzimas de restricción en 1968 por Werner Arber. En 1969, Hamilton O. Smith purificó las llamadas enzimas de restricción de tipo II, que se consideraron esenciales para la ingeniería genética por su capacidad de escindirse en un sitio específico dentro del ADN. Basándose en el trabajo de Smith, Daniel Nathans mejoró la técnica de recombinación del ADN en 1970 a 1971 y demostró que las enzimas tipo II son útiles para estudios genéticos. Aproximadamente en la misma época, Paul Berg desarrolló métodos para dividir las moléculas de ADN en sitios seleccionados y unir segmentos de ADN de un virus o plásmido, que luego podría ingresar a las células bacterianas o animales. Finalmente en 1973, Stanley N. Cohen y Herbert W. Boyer se convirtieron en los primeros en insertar genes recombinados en células bacterianas, que luego se reprodujeron (48).

#### **2.2.6. Clonación molecular**

En biología, un clon es un conjunto de células u organismos individuales cuyo origen es un solo progenitor. Esto indica que los descendientes de un clon son genéticamente idénticos. El término clon se ha expandido a la tecnología de ADN recombinante, el cual ha proporcionado la capacidad de generar miles de copias a partir de un fragmento de ADN. El método consiste en insertar el fragmento de ADN de interés, en una molécula de ADN (un vector) que permita que esta se replique dentro de una célula viva simple, como una bacteria. Los vectores más usados, son los plásmidos de formas circulares (Figura 4).

#### **❖ Procedimiento para la clonación**

##### **a) Aislamiento de ADN**

Extracción del ADN de las células: Existen una variedad de métodos para aislar el ADN de la célula, dependiendo del tipo de célula. Primero, se necesita eliminar la membrana celular, puede realizarse con un detergente. Seguidamente, el uso de una proteasa ayuda a la degradación de las proteínas y se agrega alcohol frío para precipitar el ADN.



## **b) Amplificación del gen de interés mediante (PCR)**

Desarrollado por Kary Mullis en la década de 1980. La PCR se basa en la actividad *in vitro* de la ADN polimerasa para generar millones de copias a partir de una cadena usada como molde o plantilla, para lo cual se alternan altas y bajas temperaturas para separar la hebra de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente (49) (48).

### **b.1) Componentes de una PCR**

Para realizar la PCR se necesitan los siguientes componentes:

- **El ADN molde.** La plantilla de ADN que contiene la muestra de ADN puede ser en forma monocatenaria o bicatenaria.
- **Cebadores o iniciadores.** Delimitan la zona del ADN a amplificar, son secuencias cortas de nucleótidos, normalmente de dieciocho a veintidós, monocatenarios y complementarios a las hebras opuestas de las regiones flanqueantes del fragmento de interés. Sirven como punto de partida para la síntesis de ADN. Las reacciones estándar contienen de 0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$  de cada cebador, que es suficiente para 30 ciclos de amplificación de un segmento de ADN de 1 kb. Las concentraciones más altas de cebador favorecen hibridación inespecífica y pueden conducir a falsos positivos.
- **ADN polimerasa termoestable.** Enzima que soporta las temperaturas de desnaturalización (94 - 95 °C), requerida para la separación de dos cadenas de ADN, es esencial para catalizar la síntesis de ADN a partir de la cadena molde. La *Taq* ADN polimerasa fue aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. Para una reacción estándar de 25 - 50  $\mu\text{l}$ , se utilizan 0,25 -0,50 U de enzima.
- **Trifosfatos de desoxinucleósido (dNTP).** Bases de nucleótidos de ADN (A, C, G y T) son las unidades básicas del ADN necesarias para construir la nueva cadena de ADN. Se utiliza entre 200 a 250  $\mu\text{M}$  de cada uno.

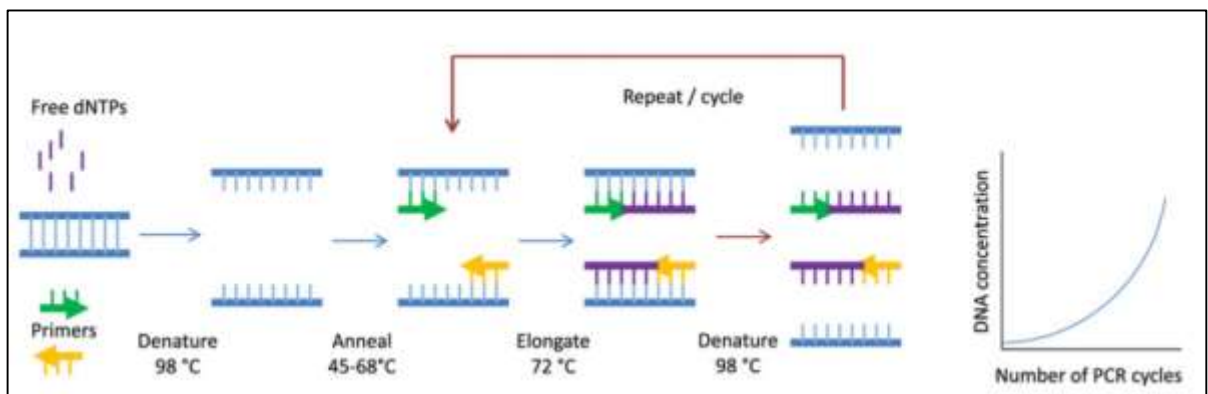
- **Cationes divalentes.** Es necesario cationes divalentes para la actividad de las polimerasas termoestables, generalmente se usa el magnesio, en forma de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ). La concentración molar de catión debe exceder la concentración molar de grupos fosfato en los dNTP y los cebadores juntos. Se utiliza habitualmente una concentración de 1,5 mM de  $\text{Mg}^{+2}$ . El exceso de  $\text{Mg}^{+2}$  dará como resultado productos inespecíficos y la insuficiencia de  $\text{Mg}^{+2}$  reducirá el rendimiento.
- **Tampón para garantizar el pH.** El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 8,3 – 8,8 a temperatura ambiente para PCR estándar.
- **Iones monovalentes.** Se usan 50 mM de KCl en la PCR estándar para la amplificación de segmentos de ADN de más de 500 pares de bases de longitud

#### **b.2) Ciclo de amplificación (Figura 2) (Figura 3)**

- **Desnaturalización.** La temperatura se mantiene entre 90 - 95 °C. La alta temperatura provoca que los enlaces de hidrógeno entre las bases de las dos cadenas del ADN molde, se rompan y las cadenas de ADN se separen. Esto da como resultado dos cadenas de ADN individuales, que actuarán como molde para la producción de las nuevas cadenas de ADN. Es importante que la temperatura se mantenga en esta etapa durante el tiempo suficiente para garantizar que las cadenas de ADN se hayan separado por completo. Durante el primer ciclo, la desnaturalización se lleva a cabo durante 5 min para garantizar la desnaturalización completa de las moléculas de ADN molde y se recomienda la desnaturalización durante 45 segundos a una temperatura de 94 - 95 °C para la amplificación del molde de ADN lineal que contienen una cantidad de G + C de 55% o menos durante 30 o más.
- **Alineamiento o unión del cebador.** La temperatura de alineamiento es crítica, si es muy alta, los cebadores se alinean mal y el ADN amplificado es bajo. Si la temperatura es muy baja, puede producirse un alineamiento inespecífico de los cebadores, lo que da como resultado la amplificación de segmentos de ADN no deseados. La etapa de reacción se da entre 50 - 65 ° C. Esto permite que los

cebadores hibriden en una ubicación específica en la plantilla de ADN monocatenario mediante enlaces de hidrógeno (la temperatura exacta depende de la temperatura de fusión de los cebadores).

- **Extensión o elongación de la cadena.** Esta etapa de reacción se da a los 72°C, para permitir que la *Taq* polimerasa agregue los dNTPs. Esta es la temperatura óptima para construir la cadena complementaria a la cadena molde. Se adhiere al cebador y luego agrega bases de ADN a la cadena individual una por una en la dirección de 5' → 3'. El resultado es una cadena de ADN nueva y una molécula de doble cadena. La duración de este paso depende de la longitud de la secuencia de ADN que se amplifica.



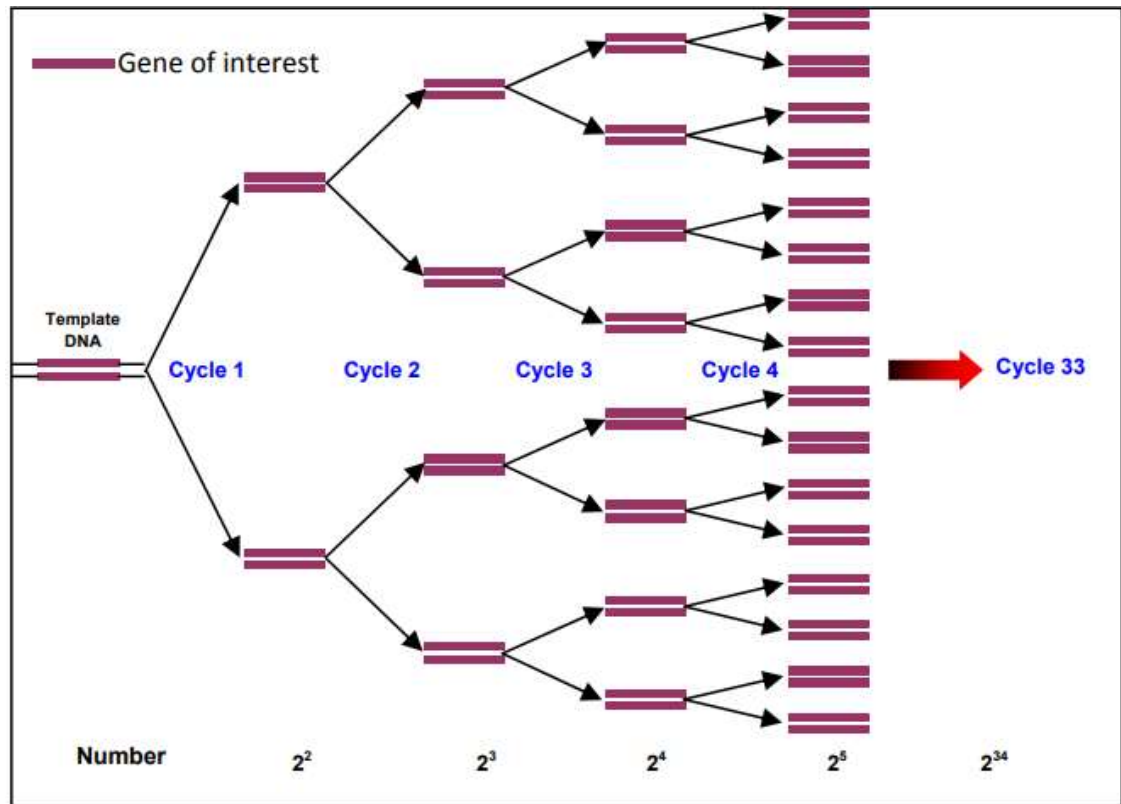
**Figura 2.** Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa.(50)

### c) Digestión

Es un proceso de cortar un ADN lineal o circular como es un plásmido mediante el uso de enzimas de restricción.

### d) Ligación

Dos o más fragmentos de ácido nucleico se unen para crear una molécula de ADN o ADN recombinante. Las cadenas se unen mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre el 3'-hidroxilo de un extremo del ADN con el 5'-fosforilo de otro, generalmente se utiliza la ADN ligasa T4.



**Figura 3.** Copia exponencial de un gen de interés durante la reacción en cadena de la polimerasa.(51)

#### e) Transformación

Es el proceso de introducir ADN exógeno a las células hospederas competentes.

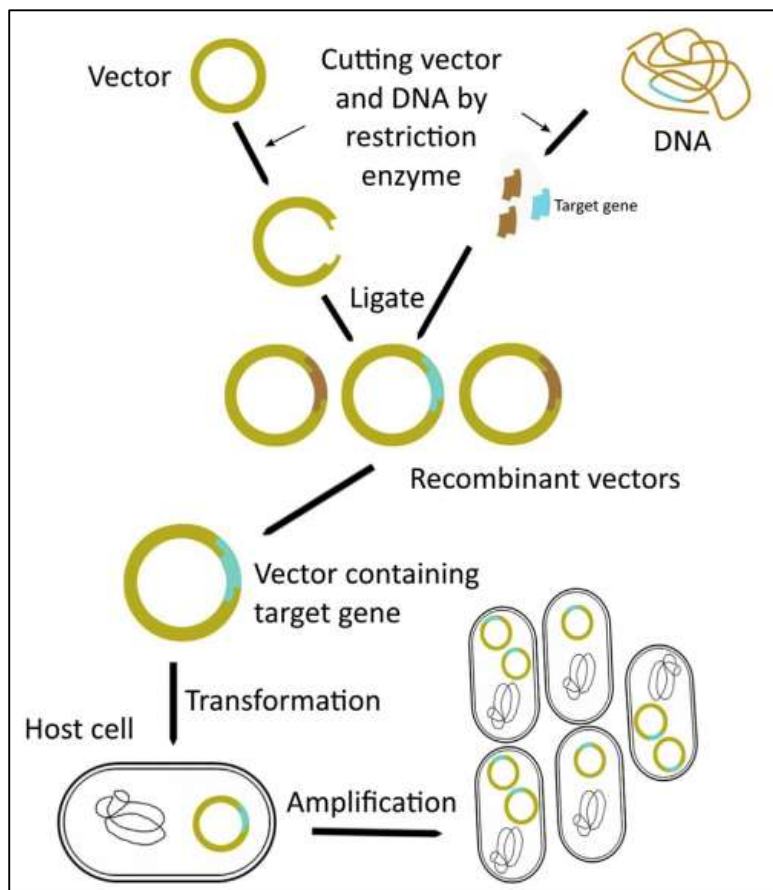
- **Células competentes.** Son células que aceptan ADN o plásmidos extracromosómicos.

Existen básicamente dos métodos generales:

- **Método químico que utiliza  $\text{CaCl}_2$ .** La técnica de transformación utilizando cloruro de calcio es la más eficiente entre los protocolos de preparación de células competentes. La adición de cloruro de calcio a la suspensión celular permite la unión del ADN plasmídico a LPS. Por lo tanto, el esqueleto de ADN

cargado negativamente como LPS se unen a las células; y cuando estas se someten a un choque térmico, el ADN plasmídico ingresa a la célula bacteriana (52).

- **Electroporación.** Permite el aumento de la conductividad eléctrica de la membrana celular y su permeabilidad. Un pulso eléctrico de alta intensidad en kilovoltios por centímetro durante unos pocos microsegundos a milisegundos provoca una pérdida temporal de la naturaleza semipermeable de la membrana celular permitiendo el ingreso de ADN foráneo (52).



**Figura 4.** Etapas del clonaje de un gen de interés (48)

**f) Detección de la clonación correcta**

- Crecimiento en placas agar
- Screening mediante PCR

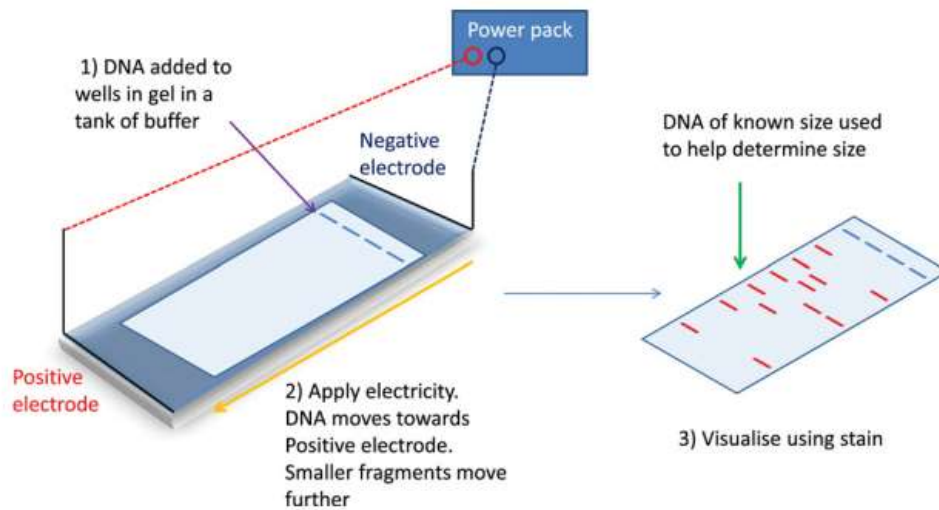
**g) Confirmación de la secuencia de interés mediante secuenciamiento del ADN**

La secuenciación de ADN es el proceso que determina la secuencia de bases de los nucleótidos (A, T, C, G) de un fragmento de ADN. El método Sanger consiste en el uso de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', así, cuando un dideoxinucleótido se integra a una hebra de ADN en elongación, esta no puede continuar haciéndolo ya que la polimerasa requiere un grupo terminal 3' OH para poder agregar otro nucleótido y este dideoxinucleótido carece de este grupo hidroxilo (53).

**h) Expresión de proteínas recombinantes**

➤ **Detección de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa**

La agarosa forma una malla porosa, dependiendo de la concentración utilizada. ADN se agrega a los pocillos en el gel embebido con buffer de corrida en una cámara de electroforesis. Luego se aplica corriente eléctrica de una fuente de poder. El ADN tiene carga negativa, por lo que se mueve hacia el electrodo positivo. El desplazamiento del ADN en el gel depende de la concentración de agarosa, voltaje, distancia recorrida, etc. los fragmentos pequeños migraran más rápido. Para conocer el tamaño del ADN, se utiliza un marcador de peso molecular. Finalizado la electroforesis, el ADN se colorea con bromuro de etidio y se visualiza utilizando la fuente de luz UV, y el ADN aparece de color naranja (54) (Figura5).



**Figura 5.** Esquema de electroforesis en gel de agarosa.(50)

#### 2.2.9. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

##### a) Clasificación

Dominio: Bacterias

Filo: Protobacterias

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especies: *Escherichia coli* DH5- $\alpha$

##### b) Descripción y significado

Esta cepa de *E. coli* deriva de la cepa K-12, no es patógena, y fue desarrollada por ingeniería para uso en clonación en el laboratorio por D. Hanahan con múltiples mutaciones que permiten transformaciones de alta eficiencia (55) (56).

Las principales mutaciones que tiene la cepa son:

- endA1, ausencia de endonucleasa I, evita que el plásmido transformado sea degradado.

- *recA1*, mantiene los plásmidos estables ya que disminuye la recombinación homóloga.
- *lacZΔM15*, permite la selección azul/blanca debido al alelo  $\alpha$ -complementación.

#### c) Estructura del genoma

El tamaño del genoma total es de 4,833,062 pb, y el genoma contiene un cromosoma circular pero no tiene plásmido. Los 4,833,062 pb del cromosoma tienen 4,636 genes, incluidos 22 genes de ARNr y 89 genes de ARNt con una longitud promedio de 919.23 pb. El contenido de GC del cromosoma es del 50,75% y es casi idéntico al contenido de GC de otras cepas de *E. coli* que se pueden encontrar en NCBI (55).

#### d) Estructura celular, metabolismo y ciclo de vida

*E. coli* es un bacilo Gram negativo. Se reproducen por fisión binaria sucesiva con un tiempo de generación de aproximadamente 30 min con un crecimiento óptimo a 37 °C. Son bacterias aeróbicas facultativas, capaces de sintetizar ATP a través de la respiración aeróbica y, si no hay oxígeno por fermentación. Esta cepa particular se puede identificar y distinguir de otras cepas de *E. coli*, examinando la secuencia genética de su subunidad ribosómica pequeña 16S, que se ha secuenciado completamente.

#### e) Ecología

Esta cepa de *E. coli* se desarrolló en el laboratorio, para procedimientos de clonación de laboratorio, y por lo tanto no existe en la naturaleza.

#### 2.2.10. Vector pJET1.2/blunt

pJET1.2 / blunt es un vector de clonación linealizado, que acepta insertos de 6 pb a 10 kb. Los extremos 5' del sitio de clonación del vector contienen grupos fosfato, por lo tanto, no se requiere la fosforilación de los cebadores de PCR.



Contiene el gen letal *eco47IR* permite la selección positiva del plásmido recombinante y que es interrumpido por la ligadura de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Solo las células con plásmidos recombinantes pueden propagarse, eliminando la necesidad de un costoso cribado azul / blanco (Figuras 6 y 7) (Tablas 1 y 2).

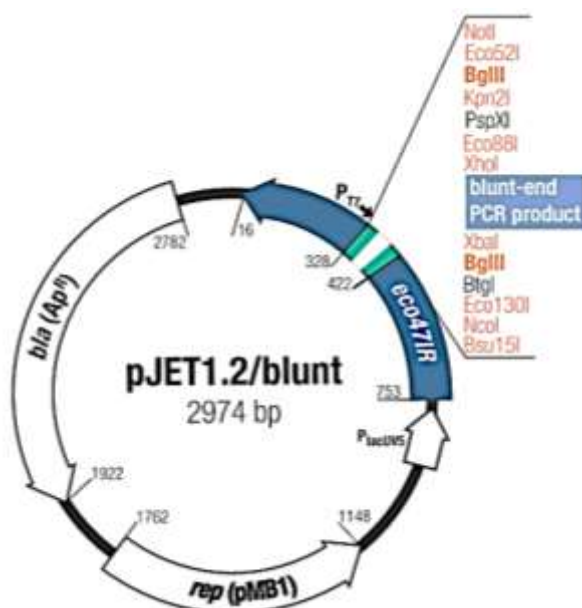


Figura 6. Mapa del vector pJET1.2 (57)

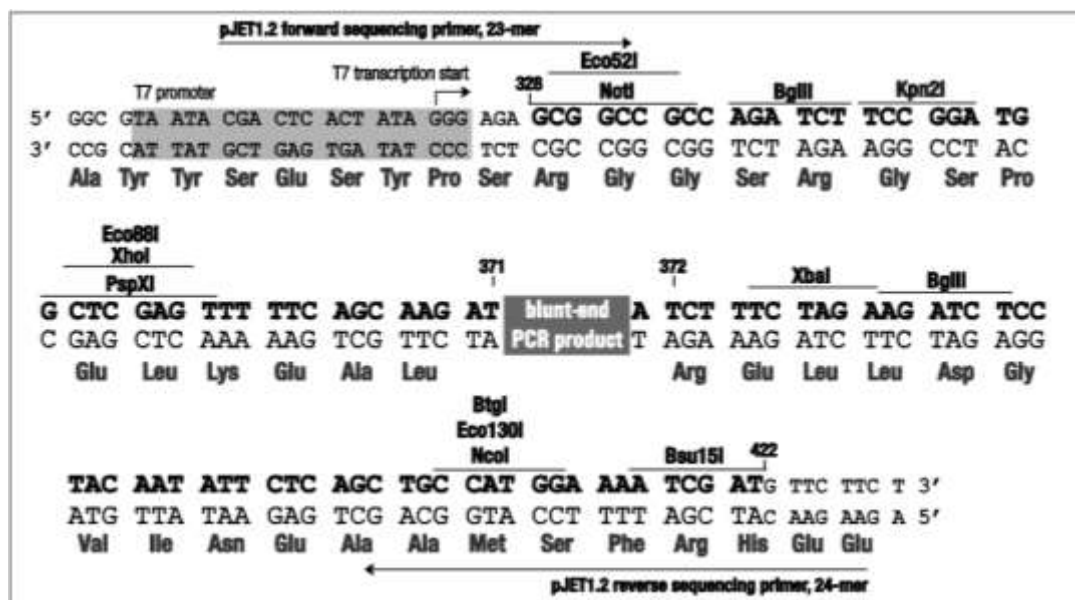


Figura 7. Secuencia de ADN de la región del clonaje múltiple (57)

**Tabla 1.** Elementos genéticos del vector de clonación pJET1,2 (57)

ELEMENTO	FUNCIÓN	POSICIÓN (pb)
rep (pMB1)	Replicón (rep) del plásmido pMB1 responsable de la replicación de pJET1.2	1762-1148
Replication start	Inicio de replicación	1162±1
bla (Ap <sup>R</sup> )	Gen de la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina.	2782-1922
eco47IR	El gen letal eco47IR permite una selección positiva del plásmido recombinante	753-16
P <sub>lacUV5</sub>	Promotor P <sub>lac</sub> modificado para la expresión del gen eco47IR a un nivel suficiente para permitir una selección positiva	892-769
T7 promoter	Promotor de la ARN polimerasa T7 para la transcripción <i>in vitro</i> del inserto clonado	305-324
Multiple cloning site (MCS)	Mapeo, cribado y escisión del inserto clonado	422-328
Insertion site	El ADN romo termina para la ligadura con inserto	371-372
Primer binding sites:		
pJET1.2 forward sequencing primer	Secuenciación de inserto, PCR de colonias	310-332
pJET1.2 reverse sequencing primer	Secuenciación de inserto, PCR de colonias	428-405

**Tabla 2.** Secuencia de los primers (57)

Nombre del primer	Secuencia del primer
pJET1.2 forward sequencing primer, 23-mer	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pJET1.2 reverse sequencing primer, 24-mer	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo y diseño de investigación**

Esta investigación es un estudio de tipo analítica, descriptivo, transversal y analítico.

### **3.2. Microorganismo y condiciones de cultivo**

*Pseudomonas aeruginosa* M211, fue aislada de muestras de suelo de los aguajales (*Mauritia flexuosa*) de Tambopata en Madre de Dios - Perú (58). Esta cepa forma parte de la colección de bacterias productoras de proteasas del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La cepa se reactivó en caldo tripticasa de soya (TSB) a 37 °C por 24 h.

### **3.3. Extracción del ADN genómico**

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de células de *P. aeruginosa* M211 de 18 h de cultivo según la metodología de solventes orgánicos (fenol-cloroformo). Para ello se centrifugaron 2 mL de cultivo a 10000 rpm en una centrifuga 5810R (Eppendorf, Alemania) durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado celular (biomasa) se le realizó dos lavados consecutivos con tampón fosfato salino para luego centrifugar a 10000 rpm por 10 min. Después se le adicionaron 600 µL de buffer TSE 1X, 60 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteinasa K (Thermo Scientific, USA), se homogeneizó por pipeteo y se incubó a 37 °C por 1 h. En seguida, se agregaron 600 µL de la mezcla de fenol/cloroformo (1:1, v/v) se homogenizó por pipeteo y centrifugó a 10000 rpm por 5 min. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se le añadieron 600 µL de cloroformo (Merck, Alemania) posteriormente se homogenizó y centrifugó a 10000 rpm por 5 min. La fase acuosa conteniendo el DNA se separó y precipitó con acetato de sodio 3 M 100 µL (Merck, Alemania) y etanol absoluto 600 µL (Merck, Alemania), se guardó a -20 °C por 2 h. A continuación, se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70 % y se centrifugó 10000 rpm por 5 min, este paso se realizó dos veces. Finalmente, el ADN extraído se resuspendió con 50 µL de buffer TE y se guardó -20 °C hasta su posterior uso. Finalmente, las muestras de ADN fueron analizadas por electroforesis.

### **3.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

La técnica de electroforesis en geles de agarosa se utiliza tanto para verificar y visualizar ADN genómico, plasmídico, productos de PCR, y digestión de ADN. Los geles de agarosa se prepararon al 1 % con tampón TBE (Tris-borato 0,09 M, EDTA 0,02 M pH 8,0). Para ello, 5 µl de cada muestra se mezcló con 3 µl de tampón de carga 6 X (azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xileno cianol 0,25 % (p/v), glicerol en agua 50 % (v/v)). Como marcador de peso molecular se emplearon 5 µl de GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 80 voltios. Finalizada la electroforesis, se tiñó con bromuro de etidio (Amresco) 0,5 mg/L durante 15 min, lavado en agua bidestilada durante 30 - 40 min y se observó en un transiluminador UV.

### **3.5. Amplificación de los genes de exoproteasas**

Se procedió a amplificar los genes de exoproteasas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores descritos en la Tabla 3. La mezcla de reacción contenía 0,8 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, tritón X-100 0,1% (v/v), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *Taq* ADN-polimerasa 1,5 U y ADN 50 ng, completando el volumen final de 25 µL con agua grado PCR. Como blanco de reacción se realizó la mezcla de los reactivos, reemplazando el ADN genómico por agua grado PCR. Las condiciones de reacción fueron: 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 1 min y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min (termociclador PerkinElmer® 2,400). Por último, se realizó una corrida electroforética y el producto se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **3.6. Secuenciación y análisis de genes de proteasas**

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen (Corea del Sur) según el método de Sanger 1977 (53). Las secuencias fueron editadas en el software Sequencher y el alineamiento múltiple se realizó con BLASTx, posteriormente las secuencias de los productos de PCR, fueron depositadas en el GenBank.

**Tabla 3.** Características de los primers utilizados en la amplificación de genes de exoproteasas de *Pseudomonas aeruginosa* M211

primer	secuencia de los primers	tamaño del producto amplificado (pb)	referencia
PF1	5'-TCTACCCGAAGGACTGATACG-3'	1691	Gupta et. al (14)
PR2	5'-AAGCGACATAAAGCAGCCG-3'		
PF3	5'-GCCGGCTACCGCGACGGCTTC-3'	756	Caballero et. al (59)
PR4	5'-TCAGGGCGCGAAGTAGCGGGAG-3'		
PF5	5'-CCTGATCK- GGCCGATAACTGCAAT-3'	1580	Andrejko et. al (10)
PR6	5'-GGAAGACASCTATCAATTCGAACAG-3'		
PF7	5'-CGGAATTCCATGCATAAGAGAACGTACCTGAAT-3'	1388	Traidej et. al (60)
PR8	5'-GGATCCTCAGGGCGCGAAGTAGCGGGAGAT-3'		

### 3.7. Clonamiento

#### 3.7.1. Ligación del producto de PCR al vector pJET1.2/blunt

La ligación del vector pJET1,2/blunt con el producto de PCR se realizó siguiendo protocolo del kit comercial “CloneJET PCR Cloning Kit” (Thermo Fisher Scientific, USA).

Primeramente, el producto de PCR fue tratado con la “DNA Blunting Enzyme” (incluida en el kit), el cual es una ADN polimerasa termoestable con actividad correctora. Para ello se realizó todo el experimento sobre hielo; se agregó a un microtubo, 10 µL del buffer de reacción 2 X, 1 µL de producto de PCR, 6 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL “DNA Blunting Enzyme”. Se incubó la mezcla a 70 °C durante 5 min. y se enfrió sobre hielo por 5 min (Tabla 4). Seguidamente, para la reacción de ligación, se agregó 1 µL del vector pJET1,2/blunt (50 ng/µL) y 1 µL de DNA Ligasa T4 siendo el volumen final de la reacción 20 µL. La mezcla se incubó a 22 °C durante 5 min (Tabla 5). Finalmente, el producto se usó en la transformación. Como control, se realizó el mismo procedimiento reemplazando el producto de PCR por agua libre de nucleasas.

**Tabla 4.** Componentes de la reacción para generar extremos romos en el producto de PCR

COMPONENTE	recombinante ( $\mu$ L)	control negativo ( $\mu$ L)	control vector ( $\mu$ L)
Buffer de reacción 2X	10	10	10
Producto de PCR	1	-	-
Agua libre de nucleasas	6	7	7
“DNA Blunting Enzyme”	1	1	1
Volumen	18	18	18

**Tabla 5.** Componentes de la reacción de ligación del inserto con el vector

COMPONENTE	recombinante ( $\mu$ L)	control negativo ( $\mu$ L)	control vector ( $\mu$ L)
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ $\mu$ L)	10	-	10
DNA Ligasa T4	1	1	1
Volumen final	20	20	20

### 3.7.2. Obtención de células competentes

Para realizar el clonamiento del gen de interés, es necesario preparar las células bacterianas para su transformación con el plásmido recombinante; esto es, hacerlas competentes. En este trabajo se usó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  siguiendo el protocolo de transformación de células químicamente competentes (61). La bacteria se cultivó en 2 mL de caldo Luria-Bertani (LB) a 37 °C por 24 h, una vez reactivada se sembró en agar LB y se incubó a 37 °C por 18 h; esto permite verificar la pureza de la cepa y obtener un cultivo axénico. Después, una colonia se cultivó en 2 mL de caldo LB a 37 °C 18 h, de este cultivo se inoculó 1 mL a 50 mL de medio LB y se incubó con agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD) de 0,3 a 0,5 por espectrofotómetro A<sub>600nm</sub>. Posteriormente, el matraz se colocó en hielo por 10 min. El cultivo se transfirió a tubos de 50 mL y se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C durante 10 min; el sobrenadante se eliminó por decantación y las células se resuspendieron en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM a 4 °C, se mezcló suavemente y se incubó 30 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de la mezcla CaCl<sub>2</sub> 50

mM con glicerol 15 % frío y se almacenó en alícuotas de 100  $\mu$ l a -80 °C hasta la transformación.

### 3.7.3. Transformación

La transformación de las células se hizo por el método de shock térmico. Tres alícuotas con 100  $\mu$ L de células competentes fueron descongeladas sobre hielo durante 10 min, luego se les agregó 2  $\mu$ L de cada producto de ligación (40 ng de ADN). Para realizar un seguimiento del proceso, un control de transformación con y sin vector fueron incluidos (tabla 6). La mezcla se dejó sobre hielo durante 30 min, seguidamente se incubó a 42 °C por 50 s usando calor húmedo, en seguida, se colocó por 5 min sobre hielo. Luego, se añadieron 500  $\mu$ L de caldo SOC estéril e incubó por 90 min a 37 °C. Después, se centrifugó a 8000 rpm por 5 min. El concentrado celular fue resuspendido con 250  $\mu$ L de caldo SOC. Finalmente, se sembró por duplicado 100  $\mu$ L por el método de siembra en superficie con un asa de Digalsky en agar LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) para seleccionar los clones transformantes y se incubó a 37 °C por 24 h.

**Tabla 6.** Componentes de transformación

Transformante	Producto de ligación ( $\mu$ L)
Células + ADN recombinante	inserto y vector (2)
Células + control vector	vector (2)
Células	sin inserto y sin vector (2)

### 3.7.4. Verificación de la presencia del inserto

Se seleccionaron seis colonias por placa y se sembraron en 3 mL de caldo LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) y en agar LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se incubaron a 37 °C por 24 h.

#### 3.7.4.1. Extracción de plásmidos por lisis alcalina

La extracción de plásmidos se realizó con el método de lisis alcalina (62) (63); de los cultivos en caldo LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) se centrifugaron 2 mL a 10000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante; el precipitado celular se resuspendió

en 100  $\mu$ L de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris.Cl 25 mM), 200  $\mu$ L de la solución II (NaOH 0,2 N y SDS 1 %), se mezcló por inversión de 2 a 3 veces y 150  $\mu$ L de la solución III (Acetato de sodio 3 M frío) se mezcló e incubó sobre hielo por 5 min. Seguidamente, se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo y se agregó un volumen igual de isopropanol (Merck) y guardó a -20 °C por 30 min. Pasado el tiempo se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C por 10 min, se agregaron 500  $\mu$ L de etanol (Merck) 70% frío, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se eliminó restos de alcohol y agua en termobloque (AccuBlock Digital Dry Bath- Labnet), a 37 °C y se resuspendió en buffer TE 50  $\mu$ L. Para comprobar la extracción de los plásmidos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.8. Purificación de plásmidos**

Para la obtención de los plásmidos recombinantes se utilizó el kit “CycloPrep™ Plasmid DNA Purification” (Amresco, USA) según las indicaciones del fabricante. Las células transformadas se cultivaron en caldo LB + ampicilina a 37 °C durante 24 h, después se cosecharon por centrifugación a 10000 rpm por 1 min. Al precipitado celular se agregó 200  $\mu$ L de la solución 1 y mezcló utilizando un vortex. Seguidamente se añadieron 200  $\mu$ L de la solución 2 y se mezcló cuidadosamente por inversión por tres veces. A continuación, se agregaron 200  $\mu$ L de la solución 3 y se mezcló cuidadosamente por inversión por tres veces. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante a una columna de purificación, seguidamente se centrifugó a 10000 rpm por 30 s y se descartó el eluido. Después, 700  $\mu$ L de la solución de lavado a la columna y se centrifugó a 10000 rpm por 30 s y se descartó el eluido. Se realizó una centrifugación adicional a 10000 rpm por 3 min para eliminar trazas de etanol. Luego, la columna de purificación se colocó en un tubo nuevo, y añadió 50  $\mu$ L de buffer TE precalentado a 70 °C, centrifugó a 10000 por 1 min y el ADN se guardó a -20 °C. Con la finalidad de determinar la concentración y pureza, se realizó una electroforesis en gel de agarosa

#### **3.8.1. Digestión con enzimas de restricción**

La digestión de los plásmidos recombinantes se realizó con la enzima *Bgl* II (10 U/ $\mu$ L) (Thermo Scientific, USA), el cual flanquea la zona de inserción del gen de interés ligado en



el vector pJET1.2/blunt. Para ello, en un tubo se mezclaron 10  $\mu$ L del plásmido recombinante, 2  $\mu$ L de buffer O 10X, 1  $\mu$ L de *Bgl* II y agua grado PCR hasta 20  $\mu$ L. Se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se incubó a 37 °C por 3 h en un termobloque (AccuBlock Digital Dry Bath- Labnet). Finalmente, los productos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa.

### **3.8.2. PCR del ADN recombinante**

Para la verificación de la presencia del gen PT4 en el vector (ADN recombinante) en las bacterias transformadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se realizó una PCR. Para esto, al plásmido PT4 purificado por el kit “Cyclo-Prep Plasmid DNA Purification” se añadió los primers del kit “CloneJET PCR Cloning” (Tabla 2), 10  $\mu$ M de cada uno (estos primers flanquean la región donde se insertó el gen PT4). Las condiciones de amplificación fueron las mismas del kit CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific™). Finalmente, el producto amplificado se observó por electroforesis en gel de agarosa.

### **3.9. Criopreservación**

Las células transformadas con el plásmido PT4 recombinante, fueron criopreservadas para posteriores pruebas para ello primero, se sembró una colonia transformada en un tubo conteniendo 2,5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ L) e incubó a 37 °C durante 24 h. Después, se añadieron 500  $\mu$ L de glicerol estéril y se distribuyó en crioviales estériles, los cuales fueron almacenados a -80 °C. La criopreservación se realizó con el fin de contar con muestras genéticamente estables y viables (64).

### **3.10. Expresión de la exoproteasa PT4 recombinante**

De un pre-inóculo de *E. coli* DH5 $\alpha$  - pPT4, se sembraron 10  $\mu$ L en 2 mL de caldo LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL y *E. coli* DH5 $\alpha$  en 2 mL de caldo LB y se incubaron a 37 °C por 24 h. Al día siguiente se inoculó los 2 mL en matraces que contenían 18 mL de medio de cultivo idénticos al pre-inóculo y fueron incubados a 37 °C a 120 rpm por 24 h. Después, los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante de cada uno de ellos se filtró a través de filtros de jeringa estériles de 0,22  $\mu$ m (Sartorius™ Minisart™ NML). Seguidamente, se añadieron 10  $\mu$ L del filtrado en forma de gota, en placas con agar skim

milk (1 %) y agar gelatina (1 %), las cuales se incubaron a 37 °C por 24 h. Las placas fueron reveladas con ácido tricloroacético (ATC) al 10 %, los halos transparentes indicaron la presencia de hidrólisis de proteínas.

### **3.11. Caracterización parcial *in silico* de exoproteasa PT4 recombinante**

#### **3.11.1. Análisis *in silico* de la estructura primaria**

El producto amplificado con los primers del kit “CloneJET PCR Cloning” (Thermo Fisher Scientific, USA), fue secuenciado por ambos lados, por servicios en MacroGen Corea del Sur, según el método de (53). Al secuenciar con los primers forward y reverse, se obtuvo dos productos, para ello se construyó una secuencia consenso. En ambos productos del secuenciamiento se verificaron la calidad de los cromatogramas utilizando el programa Chromas Lite, seguidamente fueron alineadas y editadas manualmente, en el software Sequencher. Para realizar la unión de ambas cadenas y obtener la secuencia consenso, se utilizó el programa CAP3 Sequence Assembly Program (65), cuando se obtuvo la secuencia consenso, esta se depositó en el GenBank.

El producto del secuenciamiento fue comparado con la base de datos del GenBank, mediante la herramienta de búsqueda Blast “Basic local alignment search tool” (66), permitió realizar alineamientos locales de las secuencias y compararlos con toda una base de datos, obteniendo secuencias relacionadas con el gen clonado. Con este análisis, se verificó que no se haya producido ninguna mutación durante el clonaje, ya que esta herramienta, estableció similitudes entre secuencias, indicando el porcentaje de similitud, lo cual permitió identificar al gen y la fuente (especie) de procedencia.

La herramienta ExPASy “Expert Protein Analysis System” - translate tool (67), permitió la traducción de la secuencia nucleotídica a aminoacídica. Una vez determinado el marco de lectura (ORF), se realizó el análisis por BlastP y determinó el grado de similitud con el resto de las secuencias aminoacídicas conocidas.

Después, se buscó la presencia del péptido señal con el servidor SignalP-5,0 (68), tomando en cuenta que *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa y la elastasa B una proteasa extracelular.

### **3.11.2. Análisis *in silico* de la estructura secundaria y terciaria**

El servidor **CFSSP**, del portal “BioGem Tools”, el cual predijo la estructura secundaria de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos. Este servidor predice regiones de hélice alfa, la hoja beta y los giros a partir de la secuencia de aminoácidos (69)(70).

La herramienta ExPASy - ProtParam (71), permitió el cálculo de parámetros físicos y químicos de la secuencia de aminoácidos analizado. Estos parámetros calculados incluyeron el peso molecular, punto isoelectrico (pI) teórico, composición de aminoácidos, índice de inestabilidad (II), estabilidad de la proteína en un tubo de ensayo (72), índice alifático (se define como el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas como alanina, valina, isoleucina y leucina) y promedio general de hidropatía (GRAVY), se calcula como la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos, dividido por el número de residuos en la secuencia.

Para realizar el modelamiento de la exoproteasa PT4 recombinante, se descargó una estructura molde de la base de datos Protein Data Bank (PDB). La estructura escogida como molde fue 1EZM, el cual es una Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa*, en difracción de rayos X (13). Se utilizó el programa Cn3D 4.3.1 el cual permitió realizar alineamientos estructurales comparando dos secuencias que posean datos de estructura, o entre una secuencia con información estructural y una secuencia problema y visualizarlo en formato 3D, identificar los residuos de unión a cofactor y residuos del sitio activo. La comparación se realizó por homología.

### **3.12. Curva de crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$ - pPT4**

La curva de crecimiento se realizó con la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  - pPT4, cuyo sobrenadante se comprobó la producción extracelular de proteasa en agares skim milk y gelatina. Del pre-inóculo se sembró 10  $\mu$ L de *E. coli* DH5 $\alpha$  - pPT4 en 2 mL de caldo LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL e incubó a 37 °C por 24 h. En seguida, se inocularon 200  $\mu$ L de este cultivo, en un matraz que contenía 2 mL de caldo LB idéntico al de reactivación e incubó con agitación a 120 rpm a 37 °C por 12 h. Después, el cultivo se inoculó a un matraz con 18 mL de medio e incubó en las condiciones antes descritas. De este cultivo se añadieron 10 mL a 90 mL de caldo LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. El cultivo se ajustó a una densidad óptica (DO) entre 0,1 a 0,5 para iniciar la curva de crecimiento.

Los matraces fueron incubados a 120 rpm a 37 °C por 11 h. El muestreo se realizó midiendo la densidad óptica

### **3.13. Inducción de la expresión de exoproteasa PT4**

Después de hallar la fase logarítmica en la curva de crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  - pPT4, se realizaron las pruebas de inducción con IPTG. Para esto se realizó un pre-inóculo como fue descrito previamente, el volumen final de los matraces fue de 50 mL. Se utilizaron dos con *E. coli* DH5 $\alpha$  - pPT4 con y sin inducción con IPTG; y uno con *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Los cultivos iniciaron con una DO de 0,1 a 0,5, bajo las mismas condiciones de la curva de crecimiento. Se indujo con IPTG 1 mM a partir de las 2,5 h de iniciar el cultivo. Se recolectaron muestras desde las 4 a las 12 h de cultivo con intervalos de 2 h después de la inducción.

Después, las células se cosecharon por centrifugación a 10000 rpm, 4 °C por 10 min. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su uso (sobrenadante I). El precipitado celular se resuspendió en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 y se realizó la lisis celular por sonicación (10 s on, 10 s 10 off por 10 ciclos a 10  $\mu$ m de amplitud). Después de la lisis, la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C por 10 min, para eliminar los restos celulares el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo (sobrenadante II). La actividad proteasa se midió en los sobrenadantes I y II, los datos fueron procesados en el software Statistica.

### **3.14. Ensayo de la actividad proteolítica**

La actividad de la proteasa recombinante se determinó en el extracto crudo, utilizando como sustrato azocaseína (Sigma-Aldrich, USA), siguiendo la metodología descrita por Coêlho et. al (73) con algunas modificaciones. Así, se mezclaron 500  $\mu$ L de azocaseína al 0,65% (p/v) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8 con 500  $\mu$ L de los sobrenadantes I y II (sobrenadante del cultivo y lisado celular o del cultivo) e incubó a 37 °C por 30 min. Luego, las reacciones fueron detenidas con 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10 % (p/v), se colocaron sobre hielo y centrifugaron a 10000 rpm por 10 min. El blanco de reacción contenía 500  $\mu$ L de azocaseína al 0,65% (p/v) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8, incubado a 37 °C por 30 min. Después, se agregaron 500  $\mu$ L de ATC, 500  $\mu$ L del extracto crudo y se

centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Finalmente, 100  $\mu$ L del sobrenadante muestra y del blanco fueron transferidos a una microplaca de 96 pocillos, se mezcló con 100  $\mu$ L de NaOH 0,5 M y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 430 nm. La actividad fue expresada en U/mL, donde una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que aumentó en 0,001 la absorbancia de azocaseína hidrolizada por min de reacción.

El sobrenadante (extracto crudo) que presentó mayor actividad enzimática, fue concentrado 10 veces con una membrana de 10 kDa y se usó para los ensayos posteriores.

### **3.15. Caracterización parcial de exoproteasa PT4 *in vitro***

#### **3.15.1. Cuantificación de proteínas solubles mediante método Bradford**

Con la finalidad de cuantificar la concentración de proteínas solubles, se utilizó la técnica según Bradford (74), la cual al mezclar proteínas con el colorante azul de Coomassie, éste se adhiere a las proteínas, reaccionando con los residuos de arginina, histidina, lisina, triptófano y fenilalanina; por lo cual, permite el viraje de color rojizo a azul, ya que la forma aniónica se estabiliza por estas interacciones hidrofóbicas e iónicas. Este viraje de color se mide a 595 nm y es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

Para ello, primero se realizó una curva estándar a partir de la dilución de la albúmina sérica bovina (BSA) (Amresco, USA) cuya concentración del stock fue 10 mg/mL, de esta se hicieron diferentes diluciones para obtener las concentraciones de 12,5, 25, 50, 75, 100, 200, 500 y 800  $\mu$ g/mL (por triplicado). De cada una de las diluciones se utilizaron 20  $\mu$ L por pozo en placas de 96 pocillos. Luego, se añadieron 180  $\mu$ L del reactivo de Bradford e incubó 5 min en oscuridad, después se midió a 595 nm. Para realizar la cuantificación de la muestra, se mezclaron 20  $\mu$ L de extracto crudo y 180  $\mu$ L de reactivo. El blanco consistió en 20  $\mu$ L de agua bidestilada y la misma cantidad de reactivo usado para las muestras. Se mezcló por pipeteo y se dejó incubar la reacción en oscuridad a 22 °C por 5 min. Transcurrido el tiempo de reacción, se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó directamente por interpolación de la lectura obtenida en la curva de calibración con BSA.

### **3.15.2. Determinación de actividad enzimática de exoproteasa PT4 en geles de poliacrilamida**

Se realizó una zimografía, la cual permite la detección de proteasas activas en geles SDS-PAGE. Para ello se preparó un gel de poliacrilamida de 10 x 10,5 cm x 0,75 mm empleando los soportes del equipo Cleaver Scientific LTD (UK) con una concentración de acrilamida del 8 % en el gel de resolución y del 5 % en el gel empaquetamiento bajo condiciones no reductoras (75) y adaptado para la detección de actividad de proteasa mediante el uso de caseína como sustrato. Como buffer de corrida se utilizó Tris-HCl pH 8,0. El extracto crudo a una concentración de 10 µg de proteínas, fue tratada en condiciones no desnaturizantes con tampón de carga libre de β-mercaptoetanol y se cargó en el gel sin calentamiento previo.

La separación electroforética vertical, se desarrolló en un equipo omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System (Cleaver Scientific LTD) durante 60 min a 120 V constante, empleando una fuente PowerPRO 300 Power Supply, 300 V, 700 mA, 150 W (Cleaver Scientific LTD). Después de la corrida electroforética, el gel nativo fue sumergido en tampón renaturalizante (Triton X-100 2,5% (v/v) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0) se incubó a 30 °C por 20 min con agitación constante para retirar el SDS. Posteriormente, el gel se lavó dos veces con Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e incubó a 60 °C durante 30 min en una solución de caseína de 10 mg mL<sup>-1</sup> en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Finalmente, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 a 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, la región de actividad de proteasa aparece como una banda clara contra un fondo azul oscuro donde la proteasa ha digerido el sustrato. Se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard Protocol (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **3.15.3. Efecto del pH en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante**

Para hallar el pH óptimo de la exoproteasa PT4 recombinante, se empleó como sustrato la azocaseína al 0,65% acondicionado en siete buffers de pH a 50 mM de concentración. Así, se utilizaron los buffers acetato de sodio (pH 4 y 5), fosfato de sodio y potasio (pH 6 y 7), Tris-HCl (pH 8 y 9) y glicina-NaOH (pH 10). Se incubó a 37 °C por 30 min y la actividad se midió siguiendo las condiciones del ensayo descrito anteriormente.

#### 3.15.4. Efecto de la temperatura en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante

Para determinar la temperatura óptima de la exoproteasa PT4 recombinante, se empleó como sustrato la azocaseína al 0,65% en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8. Las temperaturas a las cuales fue incubada la proteasa estuvieron en el rango de 20 a 100 °C con incrementos de 10 °C. Se incubó por 30 min y la actividad se midió siguiendo las condiciones del ensayo anteriormente descrito.

#### 3.15.5. Efecto de la temperatura en la estabilidad de exoproteasa PT4 recombinante

El efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima recombinante fue determinado empleando como sustrato la azocaseína al 0,65% en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8. Las temperaturas a las cuales fue incubada la proteasa fueron 40, 50 y 60 °C por 1, 2, 3, 4, 8 y 24 h. A cada muestra recolectada, se determinó la actividad enzimática a los óptimos de pH y temperatura. La actividad residual se expresó como porcentaje respecto a la actividad enzimática inicial.

#### 3.15.6. Efecto de los inhibidores en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante

El efecto de los inhibidores en la enzima recombinante se evaluó preincubando 100 µl de la muestra con 100 µl del agente inhibidor a temperatura ambiente por 60 min con los inhibidores descritos en la Tabla 7. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática en condiciones óptimas de pH y temperatura. Finalmente, se calculó la actividad residual en porcentaje respecto a la actividad de las proteasas en ausencia de inhibidores.

**Tabla 7.** Inhibidores utilizados con la exoproteasa PT4 recombinante

Inhibidor	Grupo de proteasas	Concentración (mM)	
PMSF <sup>1</sup>	Serine protease	1	10
EDTA <sup>2</sup>	Metaloproteasas	1	10
E-64 <sup>3</sup>	Cisteín proteasas	0,1	0,5
Pepstatin A	Aspartil proteasas	0,005	0,025

<sup>1</sup>Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, <sup>2</sup>Sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético, <sup>3</sup>Trans - epoxisuccinil - L - leucilamido (4 - guanidino) butano.

### **3.15.7. Efecto de iones metálicos en la actividad de exoproteasa PT4 recombinante**

El efecto de los iones metálicos en la actividad de la exoproteasa, se evaluó preincubando 180  $\mu$ L de la muestra con 20  $\mu$ L de las soluciones  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  (10 mM) a 22 °C por 60 min. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática en condiciones óptimas de pH y temperatura. Finalmente, se calculó la actividad residual, la cual fue expresada como porcentaje de actividad comparada con un control sin la presencia de iones metálicos.

## **3.16. Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas**

### **3.16.1. Extracción de proteínas hidrosolubles de semillas de leguminosas mediante precipitación isoelectrónica**

Todas las extracciones se realizaron a partir de harina de las semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi), *Phaseolus lunatus* (pallar) y *Erythrina edulis* (pajuro). La metodología utilizada para la obtención del concentrado proteico (CP), fue según lo descrito por Intiquilla et. al (76).

Para la extracción de las proteínas solubles de las semillas de *Lupinus mutabilis*, se realizaron dos pasos previos. Primero, la deslupinización consiste básicamente en eliminar los alcaloides (confieren sabor amargo); para esto las semillas se hidrataron con agua destilada en una proporción 1/6 (p/v) durante 16 h, luego las semillas se cocieron por 60 min, para facilitar la difusión de los alcaloides. Después, las semillas se lavaron durante 72 h con cambio de agua cada 6 h y finalmente se secaron a 42 °C. El segundo fue la deslipidización con solventes orgánicos. Previamente, las semillas secas pasaron por un molino manual; y luego por un molinillo eléctrico de café para reducir el tamaño de partícula. Para desengrasar, se utilizó etanol absoluto, la relación harina/solvente fue de 1:4 (p/v) con agitación constante por 3 h. A continuación, se centrifugó a 8000 rpm por 15 min en una centrifuga modelo 5810R (Eppendorf). El precipitado fue sometido al mismo ciclo de extracción cinco veces y se secó a 42 °C. Por último, la harina se pasó por un tamiz N° 60.



Para la obtención de los concentrados proteicos (CP) de *Lupinus mutabilis* (tarwi), *Phaseolus lunatus* (pallar) y *Erythrina edulis* (pajuro), se siguió la metodología descrita por Betancur et. al (77) e Intiquilla et. al (76).

La harina previamente acondicionada se suspendió en agua destilada en una relación (1:24, p/v) y se ajustó a pH 10,0 con NaOH 1N, con el fin de solubilizar las proteínas. La suspensión se hidrató durante 60 min con agitación constante a temperatura ambiente en un agitador magnético marca Ika-Combinamag (RCO) para maximizar la liberación de las proteínas solubles, seguidamente se procedió a licuar durante 6 min a 4 °C, para homogenizar la muestra, luego fue sonicado durante 3 min y se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C por 10 min. Al sobrenadante se ajustó el pH hasta el punto isoeléctrico (pH4,5 con HCl 1N) y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min. El precipitado fue resuspendido en agua destilada a pH 7,0 (1:3 p/v) y se volvió a centrifugar, este paso se realizó tres veces. Finalmente, el precipitado fue secado en liofilizador Labconco 2,5 L a -47 °C y 3,5 mPa. Para poder corroborar la calidad e integridad de los concentrados proteicos, se realizó un análisis electroforético mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes.

### **3.16.2. Hidrólisis enzimática de proteínas solubles de leguminosas**

La hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de *Lupinus mutabilis*, *Phaseolus lunatus* y *Erythrina edulis* fue realizado usando el procedimiento de Intiquilla et. al (76), para lo cual se utilizó el extracto crudo de la exoproteasa PT4 recombinante y se comparó con la enzima Alcalasa® (Sigma-Aldrich, USA), enzima comercial de origen microbiano la cual es utilizada en la hidrólisis de diferentes proteínas para la obtención de péptidos con propiedades bioactivas de distintas fuentes proteicas. La hidrólisis se realizó en una relación enzima/sustrato de 1:50 (p/p de proteína), manteniendo constante el pH 8 y 50 °C. Los experimentos del control se realizaron sin adición de enzimas. El tiempo de hidrólisis fue 2 h y la actividad se detuvo a 100 °C por 10 min. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas residuales por el método de Bradford, como lo descrito previamente y se realizó perfil electroforético en SDS-PAGE.

### **3.16.3. Separación de hidrolizados proteicos de leguminosas por SDS-PAGE**

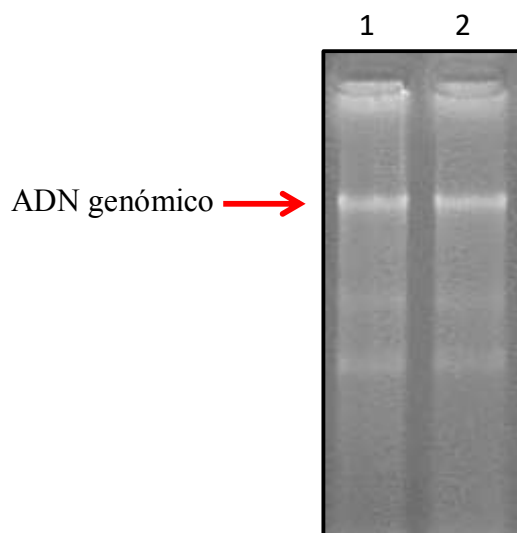
Los concentrados proteicos de las leguminosas, así como los hidrolizados proteicos, fueron observados en geles de poliacrilamida, siguiendo la metodología descrita por Laemmli et.al (78). Para ello se preparó un gel de poliacrilamida, con una concentración de acrilamida del 10 % en el gel de resolución y del 5 % en el gel empaquetamiento bajo condiciones reductoras. El buffer de corrida fue Tris-Glicina pH 8 con SDS.

Se mezclaron 10 µg de proteínas de cada muestra (CP e hidrolizados) en tampón de carga de electroforesis o tampón de Laemmli (Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 5 %, SDS 2 % y azul de bromofenol 0,1 %), las mezclas se calentaron a 100 °C por 5 min. La separación electroforética vertical, se desarrolló en un equipo omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System (Cleaver Scientific LTD) durante 60 min a 100 V constante. Después de la corrida electroforética, el gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie R-250 y posteriormente decolorado con metanol, ácido acético y agua. Se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard Protocol (Thermo Fisher Scientific, USA).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1.Extracción del ADN genómico total

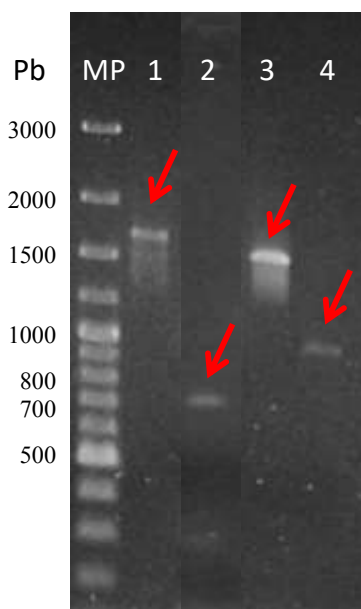
Existen varios métodos para extracción de ADN genómico de bacterias, entre ellos choque térmico, chelex, salt in, kits comerciales, entre otros. La técnica que se empleó en esta tesis fue Fenol-Cloroformo, estos solventes nos permiten la purificación del ADN ya que eliminan los lípidos y las proteínas, luego de la lisis celular. El ADN se concentró por precipitación añadiendo etanol y acetato de sodio, estos compuestos reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permiten que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. La pureza y concentración del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa, lo cual es importante ya que si el ADN está contaminado, dificultaría la amplificación de genes por PCR y afectaría la reproducibilidad de los resultados (79) (80). El ADN genómico obtenido de *Pseudomonas aeruginosa* M211, se muestra en el gel de agarosa (Figura 8). Las manchas por debajo del ADN genómico corresponden a los RNA, ya que con el método de solventes orgánicos se extrae ADN y ARN.



**Figura 8.** Ácidos nucleicos de *Pseudomonas aeruginosa* M211 en gel de agarosa al 1 %.

#### 4.2. Amplificación de genes de exoproteasas de *Pseudomonas aeruginosa* M211

Utilizando los primers descritos en la Tabla 3, los productos de la amplificación por PCR, produjeron fragmentos de ADN entre 1000 a 1500 bp. Carriles: MP, marcador de peso molecular de 100 pb; 1, primers PF1 y PR2; 2, primers PF3 y PR4; 3 primers PF5 y PR6; 4 primers PF7 y PR8. La mayoría de tamaños coinciden con los reportados a excepción del producto amplificado con los primers PR7 PF8 (Figura 9). Los productos amplificados fueron secuenciados por Macrogen (Corea del Sur).



**Figura 9.** Productos de exoproteasas de *Pseudomonas aeruginosa* M211 amplificados por PCR en gel de agarosa 1%.

#### 4.3. Análisis de las secuencias de los genes de exoproteasa amplificados

Las secuencias de los genes amplificados de exoproteasas de *Pseudomonas aeruginosa* M211 fueron editadas por el software Sequencher y comparadas por alineamiento múltiple con BLASTn y BLASTx.

El gen amplificado con los primers PF1 y PR2, presentó identidad nucleotídica de 99,79 % con cepas de *P. aeruginosa* como 1811-18R001, 1811-13R031, C11, PA\_150577, Pb18; cuyos números de acceso son CP046060.1, CP046061.1, JX003619.1, CP017306.1,

CP015650.1, respectivamente. El porcentaje de identidad aminoacídica fue 99,69 % con peptidasa M4 elastasa B de *P. aeruginosa*, algunas de las secuencias descritas son WP\_070339129.1, WP\_034044958.1, WP\_128664238.1, WP\_095540907.1. Después del análisis comparativo, la secuencia nucleotídica fue depositada en el GenBank (número de acceso MK085974).

El gen amplificado con los primers PF3 y PR4, presentó un porcentaje de similitud de 98,38 % con cepas de *P. aeruginosa* como PcyII-29, RD1-3, 1811-18R001, 1811-13R031, PA99, cuyos números de acceso son LR739068.1, CP047697.1, CP046060.1, CP046061.1, CP042967.1, respectivamente. El porcentaje de identidad aminoacídica fue 97,36 % para proteasa IV de *P. aeruginosa*, algunas de las secuencias reportadas son WP\_144149540.1, WP\_110148154.1, WP\_134587057.1, WP\_134437953.1, WP\_134470332.1.

El gen amplificado con los primers PF5 y PR6, presentó 99,55 % de identidad con cepas de *P. aeruginosa* como M28A1, YB01, PB367, PB350, 243931, cuyos números de acceso son CP015649.1, CP028132.1, CP025056.3, CP025055.2, CP041772.1, respectivamente. El porcentaje de identidad aminoacídica fue 99,72 % con metaloproteasa alcalina de *P. aeruginosa*, algunas secuencias reportadas son AFX88325.1, AFX88324.1, AFX88326.1 y 99,45 % con serina 3-deshidrogenasa de *P. aeruginosa*, AHH50025.1.

De los genes de proteasas de *P. aeruginosa* M211 amplificados, el gen que interesó clonar fue el obtenido con los primers PF1-PR2 por tener mayor reproducibilidad al amplificar y presentar alto porcentaje de similitud con una peptidasa de *P. aeruginosa*, a este gen se le denominó PT4.

#### **4.4. Clonaje del gen exoproteasa PT4**

##### **4.4.1. Extracción de plásmidos por lisis alcalina**

Luego de la transformación de las *E. coli* DH5 $\alpha$  con los productos de ligación (vector + gen exoproteasa PT4), se sembró en placas con agar LB/ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ l). Aquellas colonias que crecieron fueron repicadas tanto en caldo como en agar LB/ampicilina (100

μg/μl) para corroborar la estabilidad del clonaje. Se extrajo el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina y se realizó una electroforesis para corroborar la obtención del plásmido recombinante.

La lisis alcalina (62), permite extraer ADN plasmídico, este método se basa en la diferente resistencia a valores de pH elevados del ADN plasmídico y cromosómico. La solución GTE contribuye a desestabilizar la pared celular bacteriana. El SDS y NaOH producen la lisis celular, la desnaturalización del ADN plasmídico, cromosómico y proteínas. Después, esta solución es neutralizada con acetato potásico o sódico, el cual permite que el plásmido vuelva a su conformación covalente cerrada, ya que se forman nuevamente los puentes de hidrógeno entre las cadenas de ADN y por tanto permanece soluble, mientras el ADN cromosómico es muy largo y por tanto no logra establecer bien sus puentes de hidrógeno y forma un agregado junto con el SDS, las proteínas, los lípidos y otros componentes celulares, los cuales precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. Los plásmidos presentes en el sobrenadante, posteriormente se precipitan con etanol.

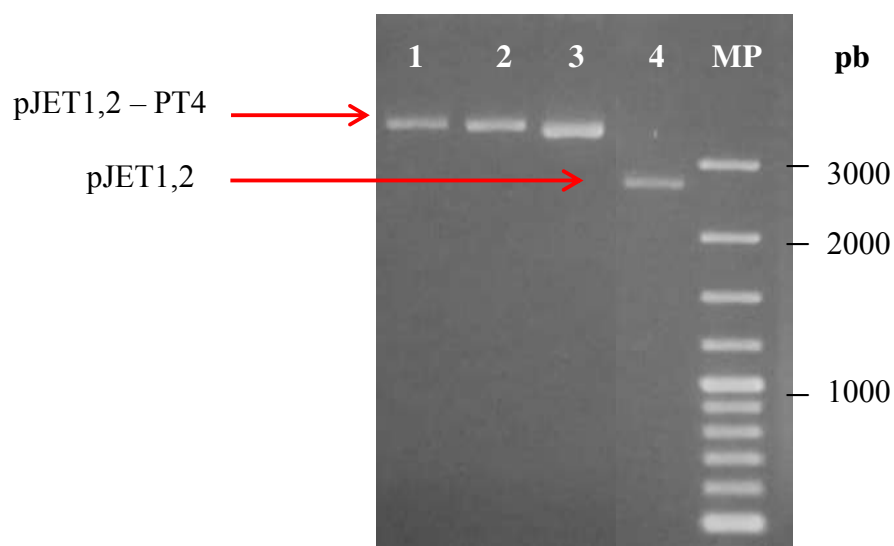
#### **4.4.2. Purificación de plásmidos por kit comercial**

Las extracciones de plásmidos recombinantes por el método de lisis alcalina, que se observaron con mayor intensidad se purificaron por kit comercial y se realizó electroforesis en gel de agarosa (Figura 10). Carriles: 1-3, plásmido pJET 1,2- PT4; 4, plásmido pJET 1,2; MP, marcador de peso molecular de 100 pb.

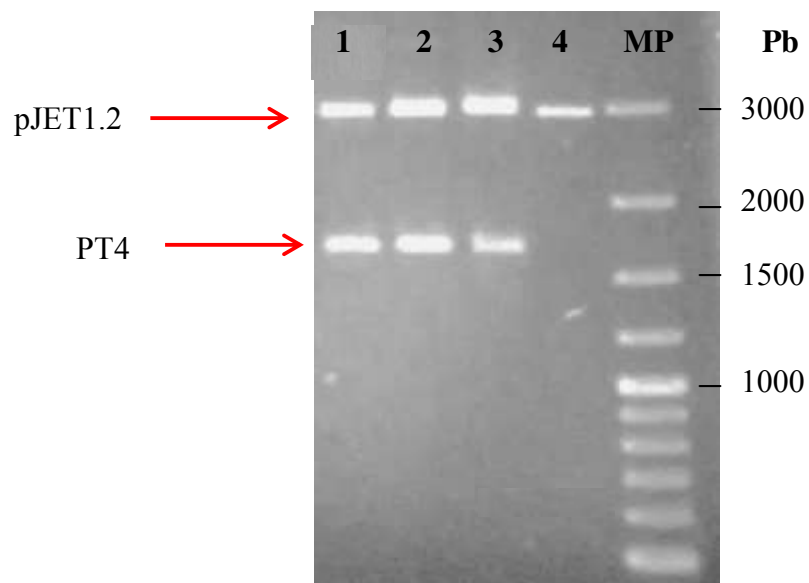
#### **4.4.3. Digestión con enzima *Bgl* II**

El plásmido pJET1.2-PT4, contiene el sitio de reconocimiento para *Bgl* II, se encuentra flanqueando el sitio de inserción del producto de PCR; por lo tanto, el vector recombinante, tratado con esta enzima libera el gen de la exoproteasa PT4 y el vector, los cuales migran diferente por electroforesis en gel de agarosa. Así, se observaron dos fragmentos, uno de 2974 pb (vector) y otro de 1700 pb (gen exoproteasa PT4).

En la Figura 11, en los carriles del 1 al 3 se observa el vector con el gen exoproteasa PT4, el cual tiene un peso molecular aproximado de 1700 pb, y coincide con el peso del producto PCR amplificado antes de iniciar el clonaje; y en el carril 4, se observa el vector linearizado de 3000 pb.



**Figura 10.** Gel de agarosa al 1% con plásmidos recombinantes. A) lisis alcalina, (b) purificados por kit comercial.



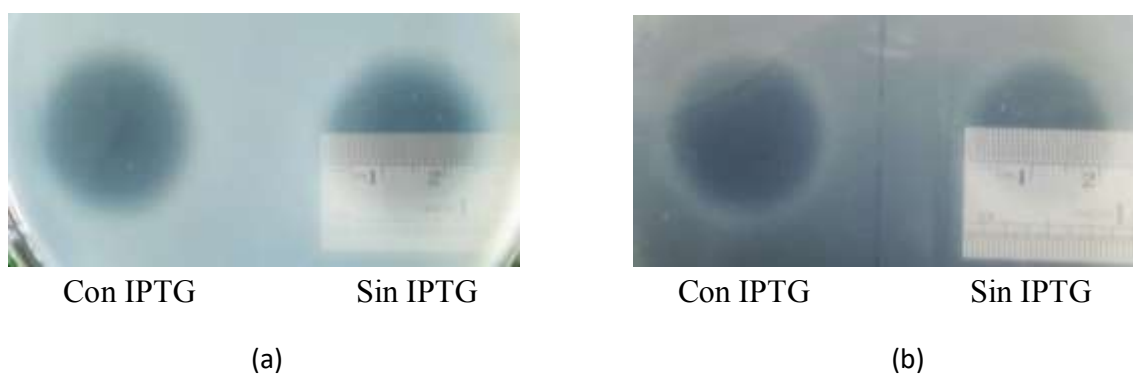
**Figura 11.** Gel de agarosa 1% con productos de la digestión del plásmido pJET1.2 - PT4 con *Bgl* II.

#### 4.4.4. PCR del plásmido pJET1,2-PT4

Una vez realizada la confirmación de plásmido pJET1,2-PT4, tanto por extracción del plásmido y digestión con enzima de restricción, se realizó una PCR utilizando los primers del vector pJET1,2 forward 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' y pJET1,2 reverse 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'. Finalmente, el producto amplificado presentó aproximadamente 1700 pb, este se secuenció por ambos lados.

#### 4.4.5. Expresión de la exoproteasa PT4 recombinante

La expresión extracelular de la exoproteasa PT4 recombinante por *E. coli* DH5 $\alpha$  – pPT4 se demostró colocando 10  $\mu$ L del sobrenadante del cultivo filtrado sobre placas con agares gelatina o skim milk. En ambos casos se observaron halos transparentes de 28 y 23 mm respectivamente (Figuras 12 a y b). A la vez, los sobrenadantes de los cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  con y sin vector, también fueron sembrados en los agares mencionados, estos no presentaron halos de hidrólisis.



**Figura 12.** Hidrólisis proteica por exoproteasa PT4 de *E. coli* DH5 $\alpha$  – pPT4 con y sin inducción por IPTG. (a) skim milk; (b) gelatina.

### 4.5. Caracterización parcial *in silico* de exoproteasa PT4 recombinante

#### 4.5.1. Estructura primaria de la exoproteasa PT4 recombinante

Al secuenciar el gen PT4 por ambos lados, se obtuvieron dos productos, a los cuales se verificó la calidad de los cromatogramas utilizando el programa Chromas Lite, con el software Sequencher se alinearon y editaron manualmente. La secuencia consenso se

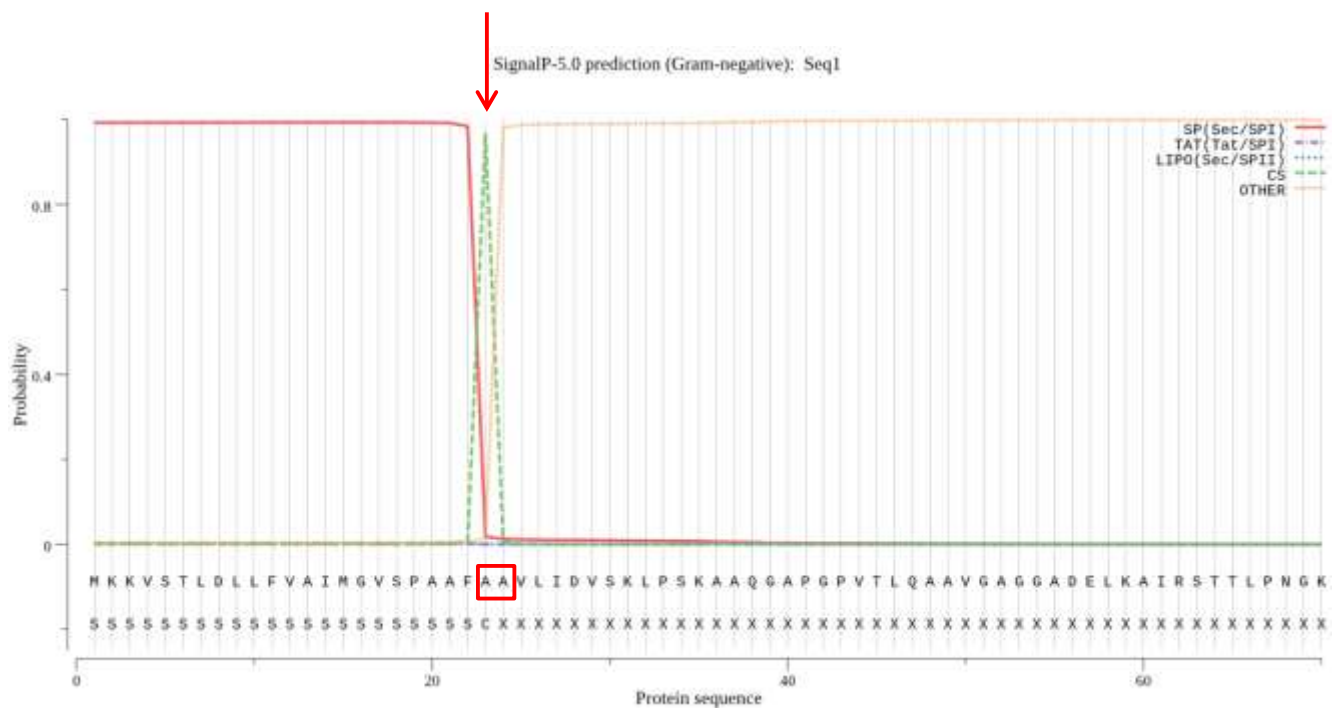


determinó por CAP3 Sequence Assembly Program, el cual resultó en un producto de 1710 pb. Se comparó con la secuencia de interés y se cortaron las regiones flanqueantes hasta obtener una secuencia de 1494 pb.

La secuencia nucleotídica del gen PT4 presentó 99,73 % de similitud con las de cepas de *P. aeruginosa*, entre los primeros seis alineamientos con E. value 0.0, tenemos: PA\_150577, Pb18, F22031, PA96, M18, PST-01, cuyos números de acceso en el GenBank son CP017306.1, CP015650.1, CP007399.1, CP007224.1, CP002496.1, AB029328.1; respectivamente.

Con la herramienta ExPASy (“Expert Protein Analysis System”), la secuencia nucleotídica fue traducida a 498 aminoácidos. Con este análisis se confirmó que la dirección del gen clonado es de 3' → 5'. El análisis BLAST de proteínas, presentó 99,40 % de similitud con peptidasa M4 y elastasa B de cepas de *P. aeruginosa*, entre los primeros seis alineamientos con E. value 0,0 fueron WP\_003113835.1, WP\_034076998.1, WP\_034006454.1, WP\_125027761.1, WP\_126577497.1, WP\_074247035.1.

El servidor SignalP-5,0 permitió determinar el péptido señal formado por 23 aminoácidos. La probabilidad de que el sitio de corte se encuentre entre los aminoácidos 23 y 24: AFA-AV es de 0,9682 (Figura 13). La secuencia clonada está conformada por 498 aminoácidos, la cual se sintetiza como una preproenzima, 23 aminoácidos (2.4 kDa) forman el péptido señal, 174 aminoácidos (18,1 kDa) el propéptido y 301 la proteína madura (46) (42) (81) (44).



**Figura 13.** Péptido señal de exoproteasa PT4. El recuadro con aminoácidos 23 y 24 indica el punto de corte probable.

La proteína contiene 498 aminoácidos, el péptido señal se encuentra entre los residuos 1 y 23, el clivaje se da entre los aminoácidos 23 y 24: AFA-AV (amarillo), los residuos del 24 al 197 conforman el propéptido (celeste) y la proteína madura (plomo), desde el aminoácido 198 hasta el 498. Por tanto, la exoproteasa PT4 madura contiene 301 aminoácidos en su estado nativo. Los residuos sombreados de azul representan la unión al calcio, los fucsia al zinc, los verdes conforman el sitio activo y los rojos son las cisteínas que forman los puentes disulfuro (Figura 14).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
ATGAAGAAGGTTTCTACGCTTGACCTGTTGTTTCGTTGCGATCATGGGTGTTTCGCCGGCCGCTTTTGCCGCGCTCCTGATCGACGTGTCCAAACTCCCCA	100									
M K K V S T L D L L F V A I M G V S P A A F A A V L I D V S K L P S	100									
GCAAGGCTGCCCAGGGCGCGCCCCGGCCAGTCACCTTGCAAGCCGCGGTGCGCGCTGGCGGTGCCGACGAAGTCAAAGCGATCCGCAGCACGACCCTGCC	200									
K A A Q G A P G P V T L Q A A V G A G G A D E L K A I R S T T L P	200									
CAACGGCAAGCAGGTCACCCGCTACGAGCAATTCACACAACGGCGTACGGGTGGTTCGGCGAAGCCATCACCGAAGTCAAGGGTCCCGGCAAGAGCGTGGCG	300									
N G K Q V T R Y E Q F H N G V R V V G E A I T E V K G P G K S V A	300									
GCGCAGCGCAGCGGCCATTTTCGTCGCCAACATCGCCGCCGACCTGCCGGGCGAGCACCACCGCGGCGGTATCCGCCGAGCAGGTGCTGGCCCAGGCCAAGA	400									
A Q R S G H F V A N I A A D L P G S T T A A V S A E Q V L A Q A K S	400									
GCCTGAAGGCCCAGGGCCGCAAGACCGAGAATGACAAAGTGGAACTGGTGATCCGCCTGGGCGAGAACAACATCGCCCAACTGGTCTACAACGTCTCCTA	500									
L K A Q G R K T E N D K V E L V I R L G E N N I A Q L V Y N V S Y	500									
CCTGATTCCCGGCGAGGGACTGTTCGCGGCCCGCATTTTCGTCATCGACGCCAAGACCGGCGAAGTGCTCGATCAGTGGGAAGGCCTGGCCCACGCCGAGGCG	600									
L I P G E G L S R P H F V I D A K T G E V L D Q W E G L A H A E A	600									
GGCGGCCCCGGCGGCAACCAGAAGATCGGCAAGTACACCTACGGTAGCGACTACAGTCCGCTGATCGTCAACGACCGCTGCGAGATGGACGACGGCAACG	700									
G G P G G N Q K I G K Y T Y G S D Y S P L I V N D R C E M D D G N V	700									
TCATCACCGTCGACATGAACAGCAGCACCAGCAGCAGCAAGACCACGCCGTTCCGCTTCGCCTGCCCGACCAACACCTACAAGCAGGTCAACGGCGCCTA	800									
I T V D M N S S T D D S K T T P F R F A C P T N T Y K Q V N G A Y	800									
TTCCGCCGCTGAACGACGCGCATTTTCTTCYCGGCGTGGTGTTCAAACGTGTACCGGGACTGGTTTCGGCACCAGCCCGCTGACCCACAAGCTGTACATGAAG	900									
S P L N D A H F F X G V V F K L Y R D W F G T S P L T H K L Y M K	900									
GTGCACTACGGGCGCAGCGTGGAGAACGCCTACTGGGACGGCACGGCGATGCTCTTCGGCGACGGCGCCACCATGTTCTATCCGCTGGTGTGCTGGACG	1000									
V H Y G R S V E N A Y W D G T A M L F G D G A T M F Y P L V S L D V	1000									
TGGCGGCCCACGAGGTCAGCCACGGCTTTACCGAGCAGAACTCCGGGCTGATCTACCGCGGGCAATCAGGCGGAATGAACGAAGCGTTCTCCGACATGGC	1100									
A A H E V S H G F T E Q N S G L I Y R G Q S G G M N E A F S D M A	1100									
CGGCGAGGCTGCCGAGTTCTATATGCGCGGCAAGAACGACTTCCTGATCGGCTACGACATCAAGAAGGGCAGCGGTGCGCTGCGCTACATGGACCAGCCC	1200									
G E A A E F Y M R G K N D F L I G Y D I K K G S G A L R Y M D Q P	1200									
AGCCGCGACGGGCGATCCATCGACAACGCGTCGCAGTACTACAACGGCATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACCGTGCCTTCTACCTGTTGG	1300									
S R D G R S I D N A S Q Y Y N G I D V H S S G V Y N R A F Y L L A	1300									
CCAATTCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGTTTCGTCGACGCCAACCGCTACTACTGGACCGCCACCAGCAACTACAACAGCGGCGCCTG	1400									
N S P G W D T R K A F E V F V D A N R Y Y W T A T S N Y N S G A C	1400									
CGGGGTGATTTCGCTCGGCGCAGAACCGCAACTACTCGGCGGCTGACGTACCCGGGCGTTACGACCGTTCGGCGTGACCTGCCCCGAGCGCGTTG	1500									
G V I R S A Q N R N Y S A A D V T R A F S T V G V T C P S A L	1500									

**Figura 14.** Secuencia nucleotídica del gen exoproteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211

#### **4.5.2. Análisis *in silico* de las estructuras secundaria y terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante**

El servidor CFSSP, del portal “BioGem Tools”, predijo la estructura secundaria de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos, la cual está formada por 89 (29,7 %), 163 (54,3 %), 44 (14,7 %) residuos que conforman  $\alpha$ -hélices, hojas  $\beta$  plegada y giros  $\beta$  respectivamente.

La herramienta “ExPASy- ProtParam” permitió el cálculo *in silico* de parámetros físicos y químicos de la exoproteasa PT4 recombinante. El número de aminoácidos fue de 301, el peso molecular 33,2 kDa y un punto isoelectrico (pI) teórico de 5,79; los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Bever et. al (42), Moihara et. al (46), y Fukushima et. al (81). Los residuos cargados negativamente (Asp + Glu) 31 y positivamente (Arg + Lys) 26. El índice de inestabilidad (II) fue de 30,85, lo cual clasifica a la proteína como estable, el índice alifático se calculó en 57,08, el promedio general de hidropatía (GRAVY) fue de -0,451.

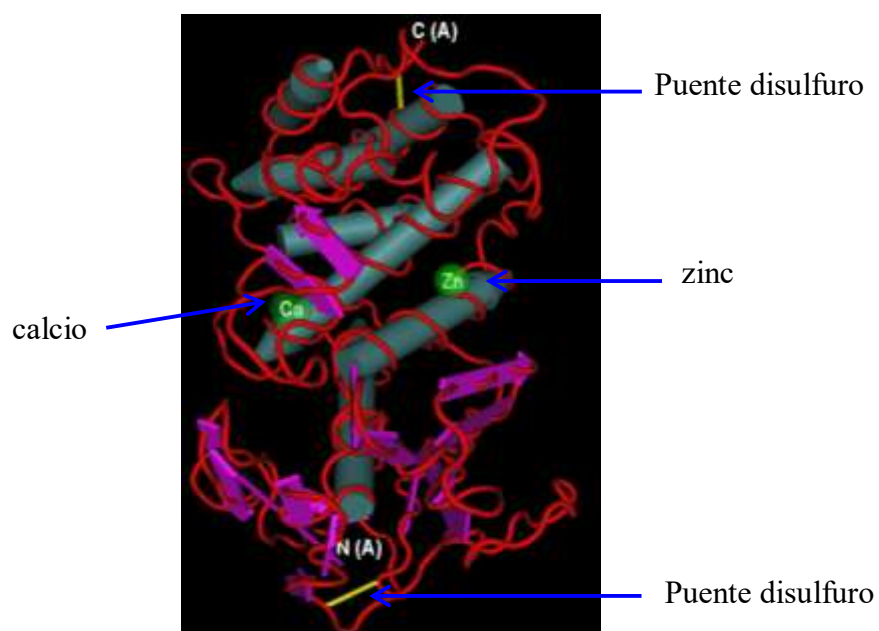
En el modelamiento de la exoproteasa PT4 recombinante con el programa Cn3D 4.3.1 (Figura 15) se observa la presencia de los sitios de unión a zinc y calcio, además de los puentes disulfuro. La estructura tiene 100% de homología, respecto a la estructura 1EZM (13) seleccionada como molde del Protein Data Bank (PDB). La secuencia que codifica la región madura de la exoproteasa PT4 recombinante contiene 301 aminoácidos, de los cuales 168 conforman el dominio C-terminal, formado por 06  $\alpha$ -hélices y 01  $\beta$  plegada y 133 residuos conforman el dominio N-terminal, formado por 01  $\alpha$ -hélice y 13 hojas  $\beta$  plegada. (Figuras 16 y 17).

Se identificaron los residuos His-140, His-144, Glu-164 de unión a zinc (Figura 18), residuos mediante los grupos carboxilo de Asp-136, Glu-172, Glu-175 y Asp-183, el grupo carbonilo de Leu-185 de unión a calcio (Figura 19), el cual se requiere para la actividad enzimática, y estabilidad de su estructura terciaria. Los aminoácidos Glu-141, Tyr-155,

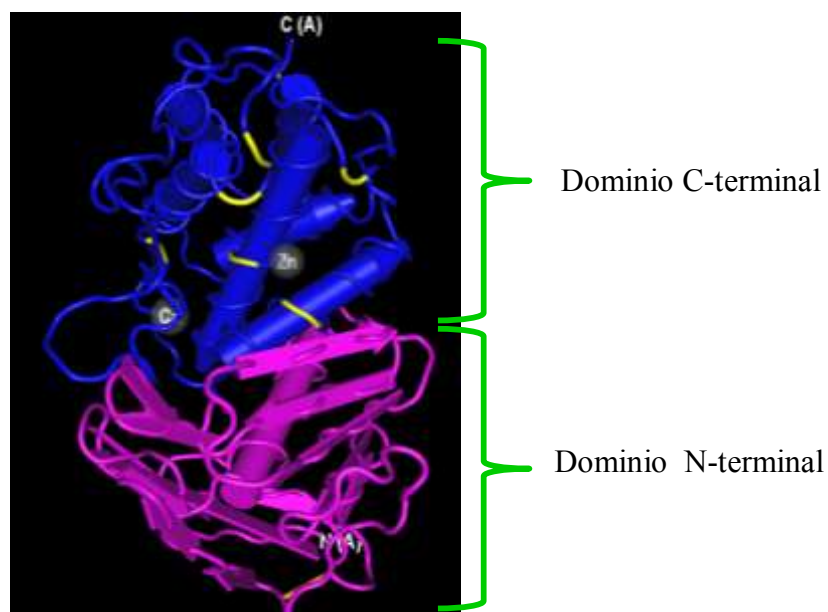
Asp-168, Arg-198, Asp-221 y His-223 conforman el sitio activo (Figura 20); todos concuerdan con lo reportado por Fukushima et. al (81).

**Tabla 8.** Composición aminoacídica de la región madura de la exoproteasa PT4 recombinante.

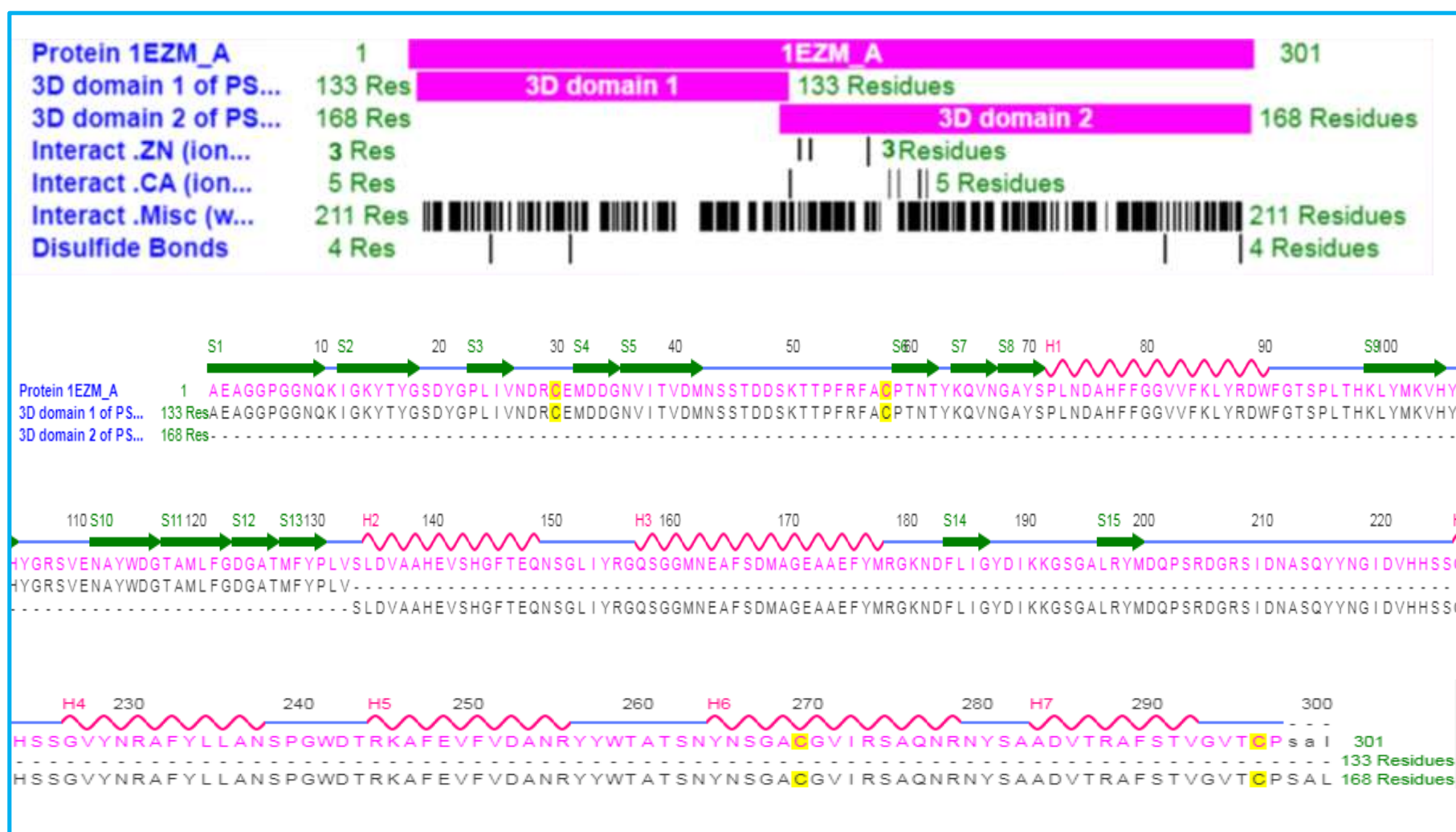
AMINOÁCIDO	NÚMERO
Ala (A)	27
Arg (R)	15
Asn (N)	20
Asp (D)	22
Cys (C)	4
Gln (Q)	7
Glu (E)	9
Gly (G)	31
His (H)	7
Ile (I)	9
Leu (L)	14
Lys (K)	11
Met (M)	9
Phe (F)	16
Pro (P)	10
Ser (S)	26
Thr (T)	18
Trp (W)	4
Tyr (Y)	22
Val (V)	19



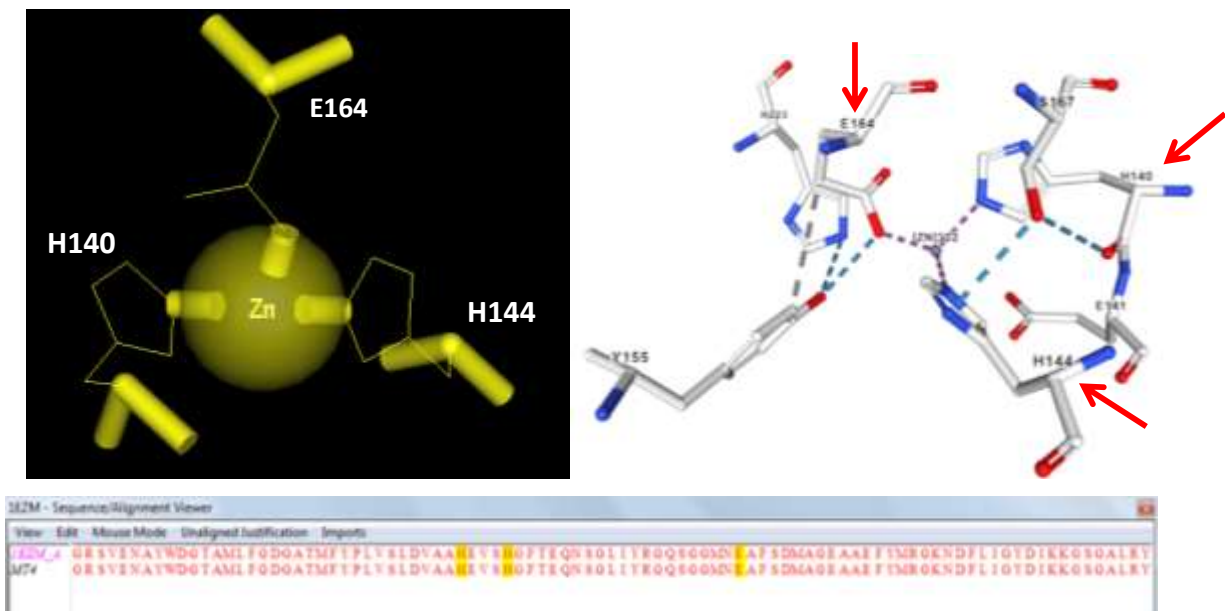
**Figura 15.** Estructura terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante obtenida de *Pseudomonas aeruginosa* M211.



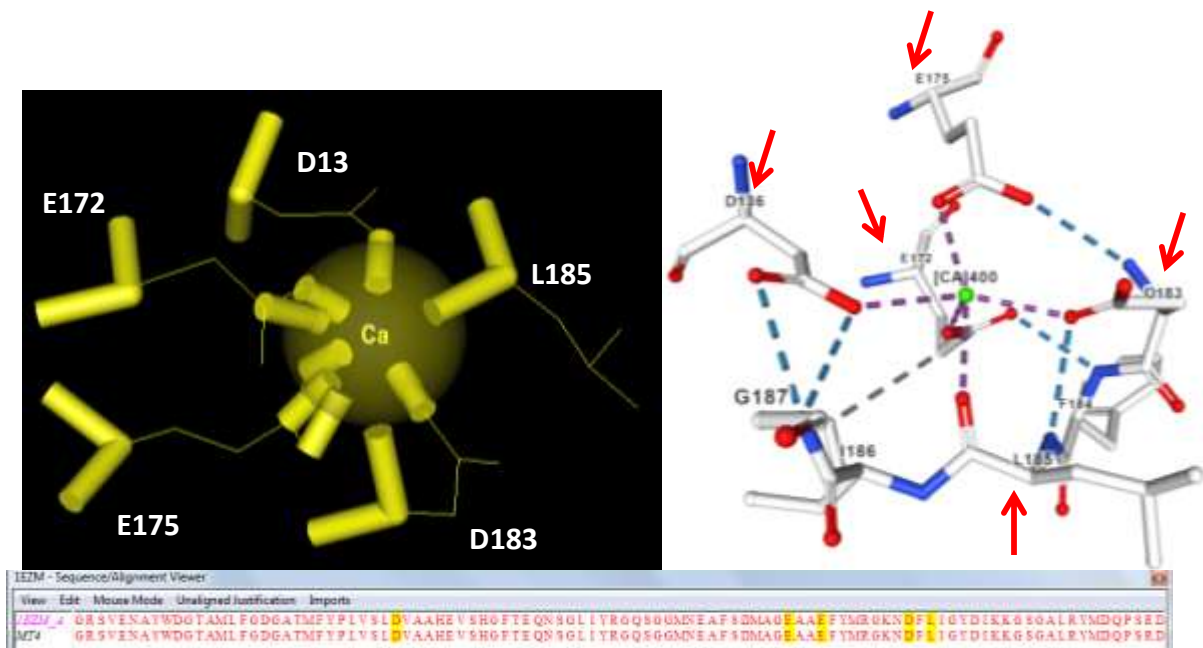
**Figura 16.** Estructura terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante, donde se muestran los dominios C-terminal en azul y N-terminal en fucsia.



**Figura 17.** Dominios C-terminal y N-terminal de la exoproteasa PT4 recombinante.

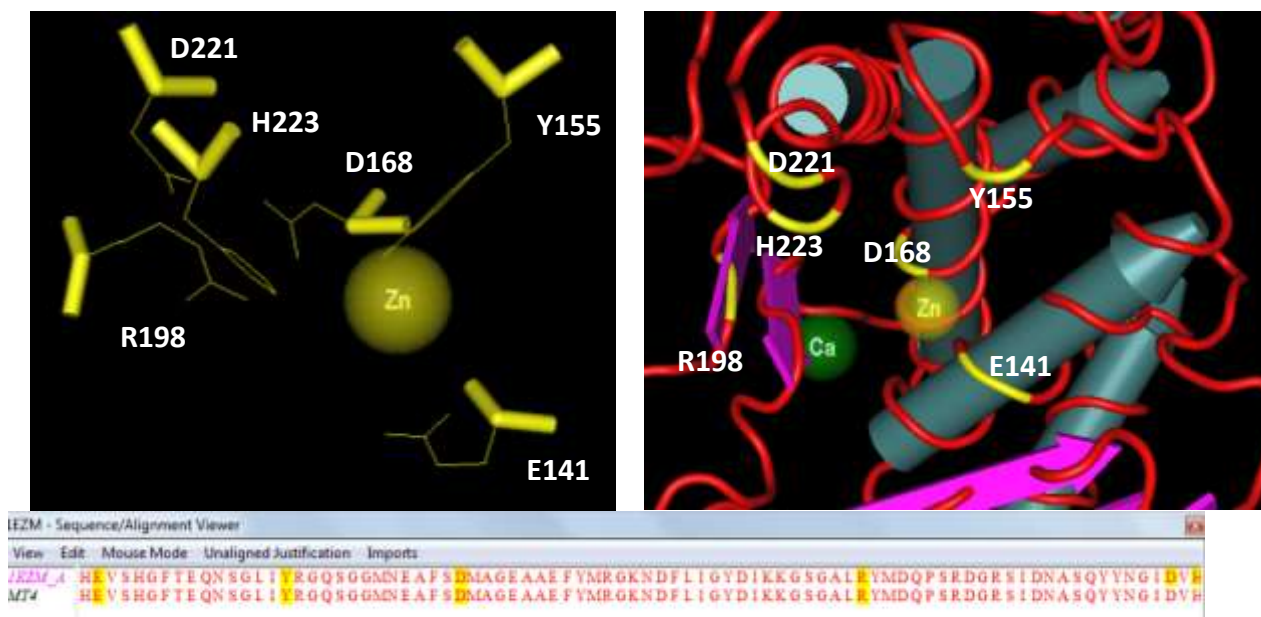


**Figura 18.** Residuos aminoacídicos de unión a zinc de la exoproteasa PT4 recombinante.



**Figura 19.** Residuos aminoacídicos de unión a calcio de la exoproteasa PT4 recombinante.

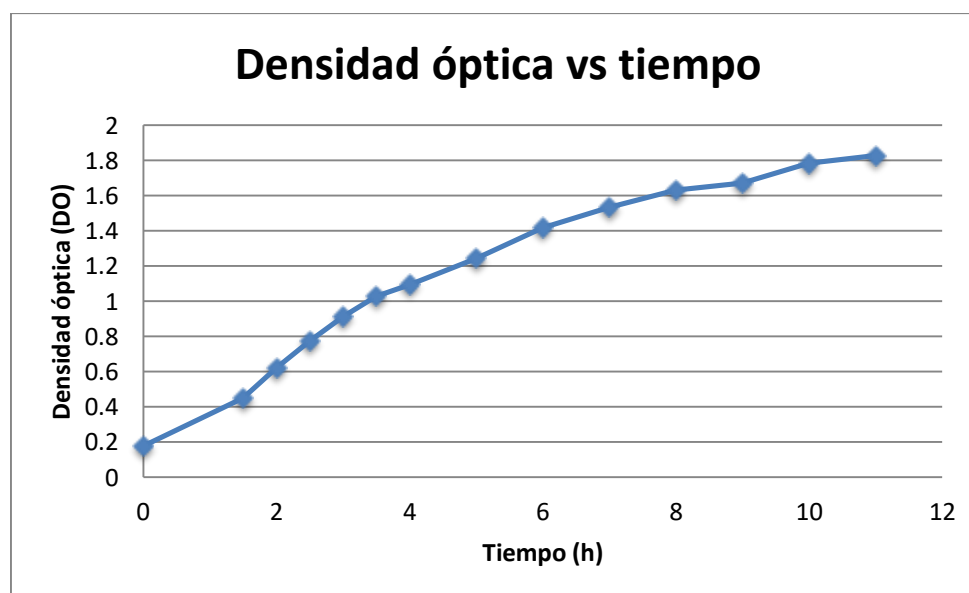




**Figura 20.** Residuos aminoacídicos que conforman el sitio activo de la exoproteasa PT4 recombinante.

#### 4.6. Producción de exoproteasa PT4 recombinante

Primero se realizó un cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  – pPT4, la fase semilogarítmica se obtuvo a las 2,5 h de cultivo. Estos experimentos se realizaron por duplicado (Figura 21).



**Figura 21.** Curva de crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  - pPT4.

#### 4.6.1. Inducción de la expresión del gen PT4 en *E. coli* DH5α - pPT4

En la Tabla 9 se observa la actividad enzimática en U/mL de las muestras recolectadas desde las 4 hasta las 12 h. Las actividades de cada muestra fueron medidas con azocaseína tanto en el sobrenadante como contenido intracelular obtenido por sonicación.

#### 4.6.2. Ensayo de la actividad proteolítica

Existen diferencias significativas, entre la actividad en el sobrenadante extra e intracelular pero no hay diferencia significativa entre los cultivos inducidos con y sin IPTG.

Esto comprueba que la bacteria conteniendo el plásmido recombinante no es inducida por IPTG, debido a que el gen LacZ ha sido reemplazado por el gen letal *eco47IR*, que permite una selección positiva de recombinantes.

**Tabla 9.** Actividad enzimática de exoproteasa PT4 recombinante producido por *E. coli* DH5α – pPT4.

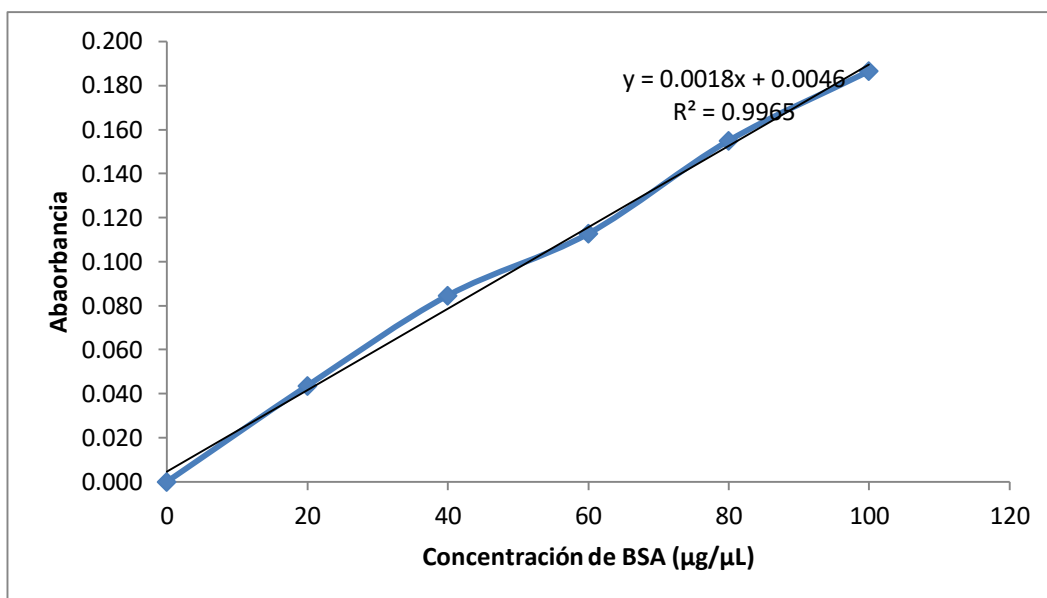
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/mL)				
Tiempo (h)	sobrenadante del cultivo		sobrenadante del contenido intracelular	
	A	A'	B	B'
4	189.63	179.6	540.27	486.69
6	248.89	246.33	440.67	435.97
8	303.77	270.33	429.43	389.19
10	361.57	322.82	359.28	339.78
12	418.64	368.19	303.86	291.03

A y B, cultivos inducidos con IPTG; A' y B', cultivos sin inducir.

#### 4.7. Caracterización parcial *in vitro* de exoproteasa PT4 recombinante

##### 4.7.1. Cuantificación de proteínas solubles

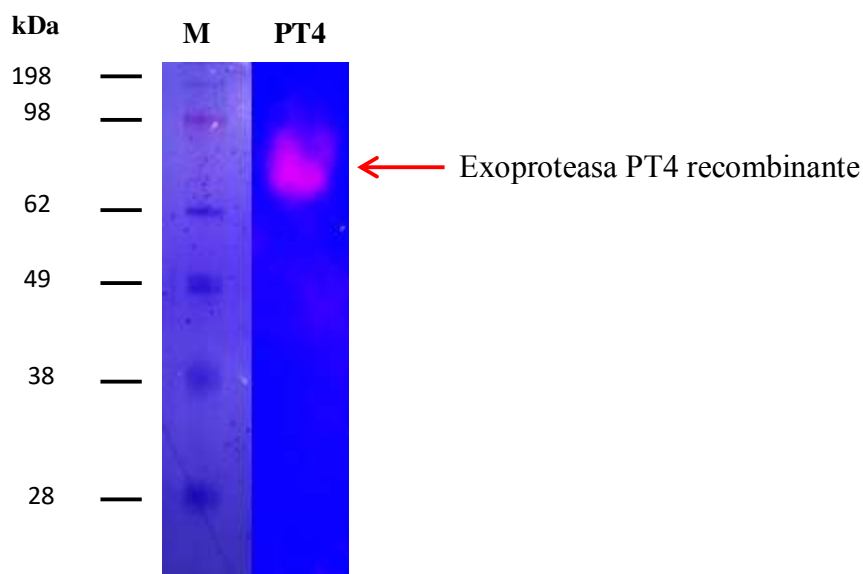
Primero, se realizó una curva estándar a partir de la dilución de la albúmina sérica bovina (BSA) cuya concentración stock fue 10 mg/mL y a partir de ella se realizaron diluciones por triplicado (Figura 22).



**Figura 22.** Curva patrón de proteínas

#### 4.7.2. Determinación de actividad de exoproteasa PT4 recombinante por zimografía

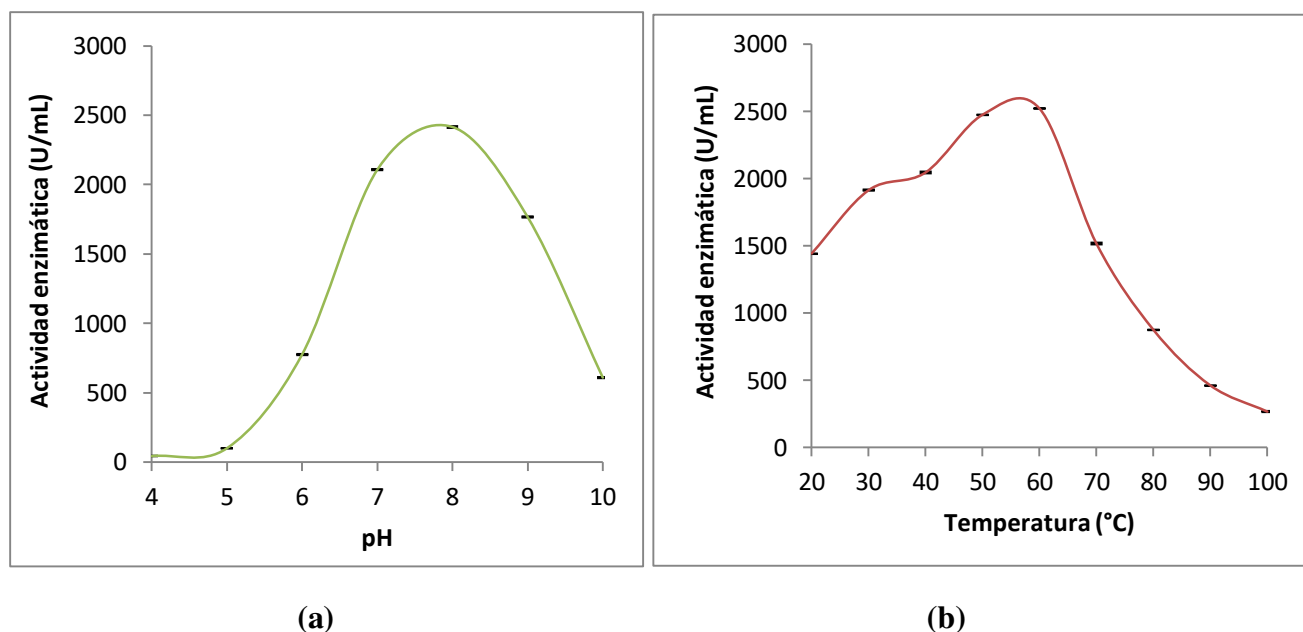
En la Figura 23 se observa una zona clara indicada con una flecha entre 62 y 98 kDa, correspondiente a la proteasa PT4 recombinante separada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones no reductoras e incubado a 60 °C durante 30 min en una solución de caseína 10 mg mL<sup>-1</sup> en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0.



**Figura 23.** Zimografía de la exoproteasa PT4 recombinante. M, marcador de peso molecular.

#### 4.7.3. Efecto del pH y temperatura en la actividad proteolítica de la exoproteasa PT4 recombinante

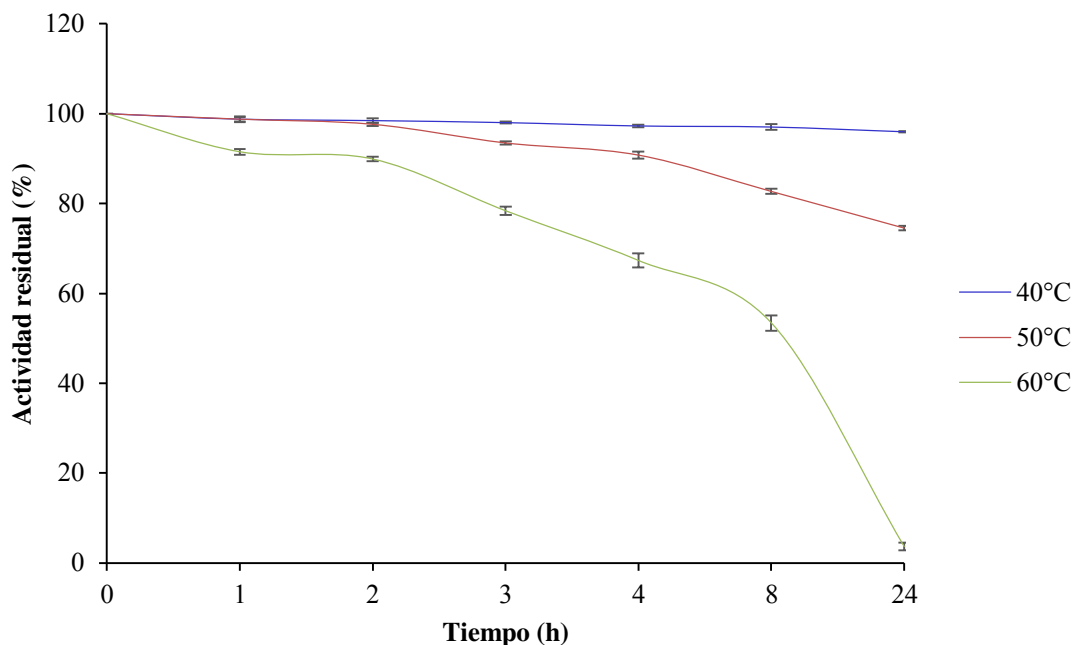
En la Figura 24a, se observa que la mayor actividad de la exoproteasa PT4 recombinante fue a pH 8. La incubación se realizó a 37 °C por 30 min para los diferentes pH. Asimismo, el estudio de la temperatura óptima indico 60 °C a pH 8 por 30 min (Figura 24b). Cabe resaltar, la enzima recombinante presenta un amplio rango tanto de pH entre 5,5 y 10,5 como de temperatura entre 20 a 100 °C.



**Figura 24.** Óptimos de pH y temperatura de la actividad de exoproteasa PT4 recombinante. Las barras de error representan la media del duplicado  $\pm$  DE.

#### 4.7.4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la exoproteasa PT4 recombinante

La exoproteasa PT4 recombinante fue estable entre 40 y 50 °C, manteniendo el 96 y 74 % de actividad respectivamente luego de 24 h de incubación. Así, a 50 °C conservó más del 90% de actividad luego de 4 h de incubación. Mientras que a 60 °C, a pesar de ser la temperatura que demostró mayor actividad, la enzima sólo mantuvo el 90% después de 2 h, posteriormente decayó al 50% a 8 h y a las 24 h su actividad residual fue 3% (Figura 25).



**Figura 25.** Estabilidad térmica de la exoproteasa PT4 recombinante.

Las barras de error representan la media del duplicado  $\pm$  DE.

#### 4.7.5. Efecto de los inhibidores en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante

Los inhibidores PMSF de serín proteasas, E-64 de cisteín proteasas y Pepstatin de aspartil proteasas no disminuyeron significativamente la actividad de la enzima. Sin embargo, la actividad de la proteasa PT4 recombinante fue reducida a  $26,3 \% \pm 2,2$  por EDTA 10 mM, un inhibidor de metaloproteasas. En consecuencia, esta enzima pertenece a este grupo de proteasas (Tabla 10).

#### 4.7.6. Efecto de iones metálicos en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante

En la Tabla 11 se observa que los iones  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  mantuvieron la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante. En tanto, en presencia de  $Ca^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  la enzima presentó el 87 y 64% de actividad residual, respectivamente; mientras que con  $Zn^{+2}$  fue 5%.

**Tabla 10.** Efecto de los inhibidores en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* M211.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN (mM)	ACTIVIDAD RESIDUAL (%)
Control	-	100,0
EDTA	10,000	26,3 ± 2,2
E-64	0,1	85,2 ± 3,9
Pepstatin A	0,025	86,3 ± 1,5
PMSF	10,000	95,7 ± 2,9

EDTA, ácido etilendiaminetetraacético; E-64, *trans*-epoxisuccinil-L-leucolamido (4-guanidino) butano; PMSF = Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenilmetilsulfonil fluoruro). Los valores de actividad residual fueron expresados como media del duplicado ± DE.

**Tabla 11.** Efecto de iones metálicos en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* M211.

ION	ACTIVIDAD RESIDUAL (%)
Control	100,0
Fe <sup>+2</sup>	64,49 ± 3,2
Ca <sup>+2</sup>	87,33 ± 0,9
Mg <sup>+2</sup>	96,10 ± 1,4
Mn <sup>+2</sup>	99,65 ± 0,2
Zn <sup>+2</sup>	5,03 ± 1,7

Los valores de actividad residual fueron expresados como media del duplicado ± DE.

#### **4.7.7. Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas**

##### **4.7.7.1.Extracción de proteínas solubles de las semillas de leguminosas**

Las proteínas solubles de *Erythrina edulis* (pajuro), *Phaseolus lunatus* (pallar) y *Lupinus mutabilis* (tarwi) fueron extraídas por metodologías descritas por Betancu-Ancona et. al (77) e Intiquilla et. al (76). Previamente, al tarwi se deslupinizo y deslipido.

##### **4.7.7.2.Hidrólisis enzimática del concentrado proteico de leguminosas**

La hidrólisis del concentrado proteico de leguminosas con la exoproteasa PT4 recombinante se realizó en una relación enzima/sustrato de 1:50 (p/p de proteína), a pH 8 y 50 °C durante 2 h, como se demostró en ensayos previos, la temperatura óptima de la exoproteasa PT4 recombinante fue de 60 °C. Sin embargo, en los ensayos de estabilidad, la mejor fue 50 °C.

Como proteasa de referencia se utilizó a la Alcalasa®. Sus óptimos de pH y temperatura son 8 y 50 °C, respectivamente, lo cual coincide con la exoproteasa PT4 recombinante.

Para esta prueba, la exoproteasa PT4 recombinante hidrolizó los concentrados proteicos de *Erythrina edulis* (pajuro), el porcentaje de proteínas residuales fue 19,7% y para Alcalasa® 8,4%. Cabe destacar que la exoproteasa PT4 recombinante hidrolizó mayor porcentaje de proteínas de *Phaseolus lunatus* (pallar) que Alcalasa®, la concentración de proteínas residuales fue 20,3 y 45,4%; respectivamente. Con relación a las proteínas de *Lupinus mutabilis* (tarwi), la enzima recombinante hidrolizó en menor porcentaje que Alcalasa® (Tabla 12).

##### **4.7.7.3. Separación de hidrolizados proteicos de leguminosas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante**

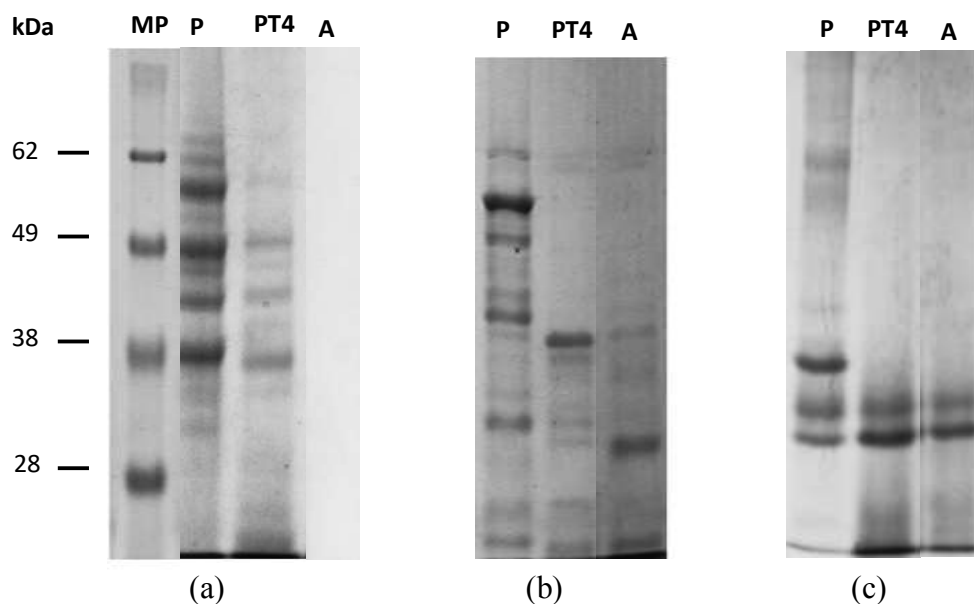
En la Figura 26, se observan los perfiles proteicos antes y después de la hidrólisis realizado tanto con Alcalasa® como con la exoproteasa PT4 recombinante. Las proteínas hidrolizadas fueron de *Lupinus mutabilis* (a), *Phaseolus lunatus* (b) y *Erythrina edulis* (c). En esta última leguminosa se obtuvo un perfil electroforético idéntico al de Alcalasa®. Asimismo, se puede señalar que las proteínas de mayor peso molecular de cada leguminosa

se transformaron en fracciones peptídicas menores a 40 kDa y mayor número de fracciones menores a 28 kDa.

**Tabla 12.** Proteínas residuales de leguminosas después de la hidrólisis con exoproteasa PT4 recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* M211

PROTEÍNAS	PROTEÍNA RESIDUAL (%)	
	ALCALASA®	PT4
<i>Lupinus mutabilis</i>	0	42,3 ± 1,6
<i>Phaseolus lunatus</i>	45,4 ± 1,2	20,3 ± 0,8
<i>Erythrina edulis</i>	8,4 ± 0,9	19,7 ± 1,4

Los valores de proteína residual fueron expresados como media del duplicado ± DE



**Figura 26.** SDS-PAGE de los hidrolizados proteicos de leguminosas con exoproteasa PT4 recombinante. (a) *Lupinus mutabilis*, (b) *Phaseolus lunatus* y (c) *Erythrina edulis*. MP, marcador de peso molecular, P: concentrado proteico; exoproteasa PT4 recombinante, A: Alcalasa®.



## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram negativo ubicuo produce factores de virulencia que le permiten asegurar su establecimiento, mantenimiento y persistencia de infección en huéspedes susceptibles. Esta bacteria es un patógeno oportunista que causa infecciones graves y letales de huéspedes comprometidos, como pacientes con fibrosis quística, quemaduras, cáncer y traumatismos oculares, por su capacidad de producir enzimas extracelulares como la elastasa capaz de degradar elastina, colágeno, inmunoglobulinas, entre otros (82) (40) (45). Estas exoproteasas tienen propiedades eficientes y rentables a nivel industrial e investigación (83). Por ello, para aprovecharlas es necesario su clonaje para optimizar los bioprocesos de producción y aceptar su uso en sectores relacionados con biotecnología y salud.

En esta investigación se presenta la expresión de la exoproteasa PT4 de *P. aeruginosa* M211 clonada en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , así como su uso en la hidrólisis de proteínas solubles de origen vegetal y animal con prospección de escalamiento y aplicación en diversas industrias biotecnológicas, principalmente en industria alimentaria. Esta enzima fue seleccionada con base a los resultados presentados por Flores-Fernández et. al (58), quienes caracterizaron tres proteasas extracelulares termoestables y alcalinas de *P. aeruginosa* M211. Estas enzimas hidrolizaron subproductos con alto contenido proteico como los solubles del proceso del fermentado de la cerveza, con el objetivo de obtener aminoácidos de interés alimentario. Sin embargo, al ser *P. aeruginosa* un patógeno oportunista, su uso en la industria alimentaria es limitado.

### 5.1. Caracterización *in silico*

#### 5.1.1. Análisis de la estructura primaria

El análisis del gen exoproteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211 presenta 99,73% y 99,40% de similitud con las secuencias nucleotídica y aminoacídica de Elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa*. El tamaño es de 1710 pb, en la Figura 13 se observa la proteína de 498 aa, con el péptido señal de 23 aa (2,6 kDa) seguido del propéptido de 174 aa (18 kDa), y la proteína madura de 301 aa (33 kDa) (14). En *Pseudomonas aeruginosa*, la presencia del péptido señal le permite exportar la proteína al medio de cultivo (84).

La expresión de la exoproteasa PT4 recombinante al medio de cultivo, es ventajosa ya que reduce la complejidad, el tiempo de los bioprocesos y el costo de purificación (85) (86), en comparación con la producción intracelular que requiere el rompimiento celular, separación de la proteína recombinante del contenido intracelular y la eliminación de los restos celulares (87) (88). Por otro lado, los inconvenientes de utilizar métodos mecánicos, físicos o químicos para el rompimiento celular pueden dañar, degradar o inactivar las proteínas de interés (89). Además, si se produce la expresión intracelular de la proteína de interés, esta puede formar cuerpos de inclusión, en consecuencia, la recuperación de la proteína es un desafío, así como, el rendimiento es bajo, puesto que se requiere solubilizar los cuerpos de inclusión y re-plegamiento de la proteína solubilizada (89) (90).

#### **5.1.2. Análisis de las estructuras secundaria y terciaria de la exoproteasa PT4 recombinante**

En el modelamiento *in silico* de la exoproteasa recombinante (Figura 15) se observa 100% de homología con la estructura elaborada por cristalografía de Thayer et. al (13), la cual está identificada como 1EZM del “Protein Data Bank”, y fue utilizada como molde en el programa Cn3D 4.3.1.

Así, en las Figuras 16 y 17, se puede diferenciar el dominio N-terminal, conformado por 133 residuos, donde se observan 13 cadenas  $\beta$  antiparalelas, una  $\alpha$ -hélice y dos residuos de cisteína forman el puente disulfuro (Cys-30-Cys-58). El dominio C-terminal, conformado por 168 residuos (desde el 134 al 301), en el cual se presenta dos cadenas  $\beta$  antiparalelas, seis  $\alpha$ -hélice, tres residuos de unión al zinc y cinco de unión al calcio, la secuencia conservada HEXXH presente en las metaloproteinasas de zinc, residuos del sitio activo; y dos que conforman el puente disulfuro (Cys-270-Cys-297). Asimismo, en la Figura 18, se observa la región de unión al zinc, el cual está conformado por His-140, His-144, Glu-164. La presencia del zinc en la estructura es fundamental para la actividad enzimática.

Menach et. al (82) estudiaron el efecto de la modificación de la secuencia HEXXH de unión a zinc por HEXXXH sobre la actividad y la estabilidad de termolisina de *Bacillus*

*thermoproteolyticus*. Para ello, construyeron variantes por mutagénesis sitio dirigida en *E. coli* JM109, logrando que los mutantes no hidrolicen caseína y afecten la termo-estabilidad de salvaje. Además, ellos indican que la conversión de HEXXH a HEXXXH elimino la actividad enzimática, pero no afecto su estabilidad. Según los autores, esto podría deberse a que al insertar un residuo en la secuencia HEXXH, las cadenas laterales de histidina se rotan y es posible que atrapen al  $Zn^{2+}$ , en consecuencia, la geometría del sitio activo cambia disminuyendo la afinidad de la enzima por el sustrato.

Por otro lado, en la Figura 19 se observa la región de unión al calcio, la cual es fundamental para la estabilidad térmica de la proteína (83). En este caso, el calcio está ligado por cuatro carboxilos donados por las cadenas laterales de Asp-136, Glu-172, Glu-175 y Asp-183 y un esqueleto carbonilo donado por Leu-185 y una molécula  $H_2O$ . En este contexto, Veltman et. al (84) indican la importancia del calcio en la estabilidad de las proteasas tipo termolisina, demostraron que la pérdida de calcio por atrapamiento con EDTA produce una autólisis rápida.

En la Figura 20, se observan los residuos Glu-141, Tyr-155, Asp-168, Arg-198, Asp-221 y His-223 formando el centro activo. El Glu141 es responsable del ataque nucleofílico sobre la molécula de agua en el enlace escindible del sustrato y la Tyr155 e His223 están implicados en la unión al sustrato. Kawamoto et. al (44) estudiaron la mutagénesis sitio dirigida de Glu-141 e His-223 en elastasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Estos cambios disminuyeron las actividades proteolíticas de las elastasas mutantes cuando se expresaron en *Escherichia coli*. También observaron que las *E. coli* que transportaban el gen elastasa de tipo salvaje expresaban la elastasa madura (33 kDa) y las que contenían la elastasa modificada expresaban la proelastasa (51 kDa) que es el precursor inactivo, la cual no presentó actividad catalítica. Por ello, concluyen que el procesamiento de proelastasa (51 kDa) a elastasa madura (33 kDa) puede ser autocatalizado por su propia actividad proteolítica. Por lo tanto, los datos sugieren que la proelastasa puede autoactivarse por efecto en cascada para la obtención de elastasa madura.

## 5.2. Expresión de la exoproteasa PT4 recombinante

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -pPT4 contiene el gen exoproteasa PT4 de *P. aeruginosa* M211 insertado en el vector pJET1.2/blunt, esta bacteria produce la proteasa PT4 dentro y fuera de la célula (Tabla 9). El sobrenadante filtrado del cultivo bacteriano hidrolizó caseína y gelatina, al formar compuestos nitrogenados solubles se observaron zonas claras alrededor de las colonias (Figura 12). Reportes de Fukushima et. al (43), Tanaka et. al (91), indican que las cepas de *E. coli* HB101 y *E. coli* JM101 conteniendo el plásmido pUC18, con este gen, cultivadas en placas de agar caseína con IPTG, estas cepas no hidrolizaron la caseína, lo cual explica que no secretan la proteasa al medio de cultivo.

### 5.2.1. Inducción de la expresión del gen exoproteasa PT4 y actividad proteolítica

En la Tabla 9, se observa la actividad enzimática en U/mL cuantificada con azocaseína, el tiempo de cultivo es directamente proporcional a la expresión del gen exoproteasa PT4, en consecuencia, se obtiene mayor concentración de exoproteasa recombinante. Lo cual indica que esta enzima no tiene efectos tóxicos o perjudiciales en el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  – PT4 tal como reportan McIver et. al (45). Asimismo, la expresión de este gen en *E. coli* DH5 $\alpha$  no está regulado, lo cual es una ventaja para el bioproceso, por un lado ahorro del uso de IPTG y por otro, los costos del proceso de purificación y la contaminación ambiental disminuyen (85) (86). Por el contrario, la producción intracelular requiere rompimiento celular y eliminación de los restos celulares y separación de la proteína del contenido citosólico (87) (88).

La expresión de un gen depende del vector y del hospedero utilizado, reportes de Fukushima et. al (44), Tanaka et. al (89), McIver et. al (46), indican que las cepas de *E. coli* HB101, JM101, JM109, no secretan proteasas al medio de cultivo. Así, después del clonaje, sembraron las colonias recombinantes en placas de caseína con IPTG y no observaron halos de hidrólisis. El clonaje y la expresión del gen *lasB* en los plásmidos pET-32a, pET22b y pET2-8b en *E. coli* BL21 no fue extracelular según reportan Raftari et al. (11), Zhu et al. (9) y Draper (8) respectivamente. A la vez, Abdullah (7) clonó y expresó este gen en el vector pGEX-KG transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$ ; luego de la lisis celular observó por SDS-

PAGE una banda entre 50 - 55 kDa. Sin embargo, Kawamoto et. al (44), expresó el gen en una *E. coli* JM109, utilizando el plásmido pUC18 y detectó actividad proteolítica en placa.

*Pseudomonas aeruginosa* M211, de la cual se obtuvo el gen exoproteasa PT4, Alejandro-Paredes et. al (5) reportan que esta bacteria antes de optimizar el medio de cultivo, la actividad proteolítica total fue 79.84 U/mL y después fue 450 U/mL a las 24 h. En el presente estudio se reporta 418.64 U/mL de la exoproteasa PT4 recombinante a las 12 h, cabe resaltar que esta actividad se obtuvo en caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/µL). En consecuencia, la optimización del medio de cultivo de *E. coli* DH5α – PT4 conllevará a una mayor producción de la exoproteasa PT4.

### **5.3. Caracterización parcial de exoproteasa PT4 recombinante**

#### **5.3.1. Zimografía.**

En condiciones no reductoras, la zimografía permitió medir la actividad proteolítica *in situ* de la exoproteasa PT4 por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% (Figura 23), pero por SDS-PAGE de esta forma se observó una banda entre 62 y 98 kDa. En este aspecto, Caballero et. al (18) y Gupta et. al (90), indican que la elastasa B de *P. aeruginosa* PA103-29, utilizando una SDS-PAGE al 10% con caseína al 0,1%, observaron una banda de 160 kDa. A la vez, Marquart et. al (91), reporta una Elastasa B de *P. aeruginosa* PA103 con un peso molecular de 100 kDa determinado por zimografía en poliacrilamida con gelatina al 0,1%. Las diferencias en el tamaño de la proteasa se pueden explicar a las condiciones de electroforesis utilizadas por los autores.

#### **5.3.2. Efecto del pH y temperatura en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante**

Los óptimos de pH y temperatura de la exoproteasa PT4 recombinante fueron 8 y 60 °C, estos coinciden con los reportados según diversos autores (92) (46) (96) (12) (97) (98) (99). Por estas condiciones, la enzima es considerada como una proteasa termoactiva. Por otro lado, la exoproteasa PT4 demostró ser estable entre 40 y 50 °C, ya que mantuvo su

actividad entre 96 y 74% respectivamente después de 24 h. A 60 °C, a las 2 y 8 h de reacción conservó 90 y 50 % de actividad y a las 24 h su actividad residual fue 3% (Figura 24). Cabe resaltar, la exoproteasa PT4 recombinante presenta mejor actividad que la reportada por Ghorbel-Bellaaj et. al (12) quienes describen que la proteasa luego de 1 h mantuvo 100% de actividad entre 30 y 40 °C, mientras que a 50 y 60 °C, conservó el 80 y 60%, respectivamente. Del mismo modo, Cheng et. al (98) describen que LasB incubada entre 30 a 60 °C por 10 min presenta actividad residual mayor a 80%. Por el contrario, Gupta et. al (92) indican que la proteasa mantuvo 100 % de actividad a 60 °C por 30 min, sin embargo entre 65 y 70 °C por 10 min de incubación, la actividad residual fue de 67 y 20% respectivamente. Asimismo, Morihara et. al (46), reportan que la enzima es estable por debajo de 50 °C y por encima de 55 °C es parcialmente inestable; pero se estabiliza con fosfato 0,1 M (pH 7) o  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, este efecto protector disminuye a temperaturas superiores a 63 °C. El análisis *in silico* de la Elastasa B, al igual que la exoproteasa PT4 recombinante, indica la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la estabilidad de la estructura terciaria, a la vez es un efector positivo (Figura 19).

### **5.3.3. Efecto de los inhibidores en la actividad de exoproteasa PT4 recombinante**

La exoproteasa PT4 recombinante luego de la incubación con EDTA 10 mM por 1 h, presento una actividad residual de  $26,3 \pm 2,2$  %, con base a estos datos, la enzima se clasificó como una metaloproteasa. Asimismo, el análisis *in silico* indica que la proteasa es dependiente de  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$  (Figuras 18 y 19), por ello en presencia de EDTA disminuye o pierde su actividad proteolítica. En este aspecto, Gupta et. al (92), Cheng et. al (98), Ghorbel-Bellaaj et. al (12) y Kocabiyik et. al (100) reportan que la actividad residual es 25 %, 28 %, 31,5 % y 0 % en presencia de 5 mM (1h), 1 mM (1h), 5 mM (30 min) y 6.25 mM (15 min) de EDTA respectivamente. Los inhibidores de serina, cisteína y aspartato proteasas como PMSF, E-64 y Pepstatina no presentan efectos significativos en la actividad de la exoproteasa PT4 (Tabla 10), lo cual coincide con lo reportado por los autores antes mencionados.

#### 5.3.4. Efecto de iones metálicos en la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante

Los iones  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  no afectan la actividad de la exoproteasa PT4 recombinante. En presencia de  $Ca^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  la enzima presentó 87 y 64% de actividad residual respectivamente y en presencia de  $Zn^{+2}$  la actividad disminuyó hasta 5%. En ningún caso, los iones metálicos mejoraron la actividad de la enzima. En este aspecto, Kessler et. al (101) indican que los cationes metálicos  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $FeCl_3$  y  $ZnCl_2$  a 0.625 mM incubados durante 30 min presentaron actividad de 100, 103, 73, 24 y 0% respectivamente. A la vez, Kocabiyik et. al (100) manifiestan que  $ZnSO_4$  2,5 mM incubado durante 15 min, inhibe completamente la actividad enzimática y  $MgCl_2$  10 mM no afecta. Asimismo, Gupta et. al (92) reportan que al incubar la enzima con iones metálicos 5 mM a 25 °C durante 60 min, la actividad disminuye a 63,2, 40,4, 56,0 y 53,9 % por efecto de  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  respectivamente. De igual forma, Ghorbel-Bellaaj et. al (12) describen que la actividad proteasa disminuye a 89,4, 83,6, 18,1 y 0 % al incubar con 5 mM de  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  por 30 min respectivamente (Tabla 11). Cabe mencionar, que la exoproteasa PT4 es una metaloproteasa dependiente de  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . Sin embargo, el exceso de estos iones inhibe la actividad, en este aspecto se infiere que el  $Zn^{+2}$  estaría actuando como un inhibidor competitivo (102) (103) (104) (105).

#### 5.3.5. Hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas

La obtención de los concentrados proteicos de semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi), *Phaseolus lunatus* (pallar) y *Erythrina edulis* (pajuro) se realizó según los métodos descritos por Betancur-Ancona et. al (77) e Intiquilla et. al (76). En el caso del *L. mutabilis*, primero se deslupinizó y luego se deslipidizó con etanol (106) (107), estos pasos previos favorecen el mayor rendimiento en la extracción del concentrado proteico de esta leguminosa (108) (109). En cuanto a la calidad de los concentrados proteicos, los perfiles electroforéticos obtenidos de *L. mutabilis* y *E. edulis* fueron similares a los descritos por Intiquilla et. al (107), Santos et. al (110) e Intiquilla et. al (76) respectivamente; y los de *P. lunatus*, a los reportados por Polanco-Lugo et. al (111).

Los productos de la hidrólisis enzimática de proteínas son péptidos de tamaños diferentes, y aminoácidos. Los péptidos pueden presentar propiedades antioxidantes, antimicrobianas,

antihipertensivas, anticancerígenas, entre otros, que influyen positivamente a la salud humana (112) (113) (114) (115). Así, Elias et. al (116) reportan que los péptidos son parte de la organización aminoacídica de la proteína, cuando estos se liberan por hidrólisis enzimática facilitan su disponibilidad y efecto biológico (117).

Por otro lado, el grado de hidrólisis de las proteínas depende de las condiciones de reacción utilizadas, tales como: concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, el tiempo y condiciones fisicoquímicas (pH y temperatura). Un factor importante es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y condiciones de reacción. Lo cual influye no sólo en el grado de hidrólisis proteica, sino también en el tipo de péptidos producidos. A la fecha, la proteasa Alcalasa® obtenida de *Bacillus licheniformis*, es la más utilizada en la industria alimentaria para la producción de hidrolizados proteicos, péptidos y aminoácidos, la cual actúa a óptimos de pH y temperatura de 8 y 50 °C (118) (119). Asimismo, los productos de la hidrólisis proteica presentaron actividades: antioxidante, antihipertensiva, hipolipemiante, anticancerígena, entre otras a partir de proteínas solubles de *Phaseolus lunatus* L, *Lupinus* sp. y *Erythrina edulis* (120) (115) (121) (76) (122) (111).

En los perfiles electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE tanto de los concentrados proteicos como de los hidrolizados con exoproteasa PT4 recombinante y Alcalasa® (Tabla 12, Figura 26), se observan diferencias en el número y tamaño de los productos. Así, las proteínas de mayor peso molecular de *Phaseolus lunatus* y *Erythrina edulis*, después de la hidrólisis se obtuvieron bandas menores a 40 kDa. Los productos de hidrólisis de Alcalasa® y exoproteasa PT4 recombinante son diferentes, ya que la primera es serin proteasa y la segunda una metaloproteasa, de lo cual se infiere que los hidrolizados proteicos presenten propiedades funcionales diferentes (112, 123).

En el perfil electroforético del hidrolizado proteico (Figura 26 a) y en la cuantificación de proteínas, Alcalasa hidrolizó totalmente el concentrado proteico de *Lupinus mutabilis*. Sin embargo, la exoproteasa PT4 recombinante hidrolizó aproximadamente el 60% de las proteínas. En este aspecto, Ruiz-López et. al (124) reportan que los compuestos fenólicos presentes en *Lupinus*, son los principales metabolitos con efecto positivo en la salud, en gran parte debido a sus propiedades antioxidantes, a través de su poder reductor, su



capacidad para eliminar e inhibir los radicales libres y su actividad quelante de iones metálicos evitando el daño del ADN y la peroxidación lipídica. Asimismo, *L. mutabilis* es usado en fitorremediación para capturar metales pesados de ambientes contaminados (125) (126) (127) (128). Por otro lado, en el perfil de hidrólisis proteica de *Phaseolus lunatus* (Figura 26 b), se observa la desaparición de las bandas mayores a 40 kDa. Al respecto, Do Evangelio et. al (129) hidrolizaron los concentrados proteicos de *Phaseolus vulgaris* L. con Alcalasa® y pepsina, el grado de hidrólisis obtenido fue bajo con Alcalasa, por el contrario, la actividad antioxidante fue mayor en comparación con pepsina (130). Asimismo, los hidrolizados proteicos obtenidos con pepsina mostraron una menor actividad antioxidante que el concentrado proteico (sin hidrólisis). Además, Polanco-Lugo et. al (111) encontraron que los hidrolizados proteicos de *Phaseolus lanatus* mejoran sus propiedades funcionales y presentaron actividades antioxidante y antihipertensiva cuando realizaron hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina. En tal sentido, al observarse perfiles similares entre el obtenido por Alcalasa y la exoproteasa PT4 recombinante se infiere que estos hidrolizados pueden presentar actividades biológicas diferentes con mayor o menor efecto. Con relación a la hidrólisis del concentrado proteico de *Erythrina edulis* (Figura 26 c), los resultados fueron similares a lo reportado por Intiquilla et. al (74). Luego de la hidrólisis, se redujo las bandas más pesadas, y se atenuaron las de 24 y 20 kDa, logrando obtenerse una mayor concentración por debajo de los 20 kDa.

Los hidrolizados proteicos mejoran las características tecno-funcionales en los alimentos como viscosidad, solubilidad, digestibilidad, absorción y alergenicidad, en comparación al concentrado proteico, incrementado así su valor biológico y calidad nutricional (123). Asimismo, los hidrolizados proteicos producidos por el uso de proteasas ofrecen productos de mayor calidad en comparación con la hidrólisis química, ya que esta última requiere el uso de ácido clorhídrico, altas temperaturas y la adición de hidróxido o carbonato sódico obteniendo productos con alta salinidad (109). Por el contrario, con la hidrólisis enzimática se obtienen péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas (120) (115) (131)(121) (122) (111), las cuales dependen del tipo de enzima, el grado de hidrólisis y la fuente de proteína (123) (129) (111) (132).

Por consiguiente, la exoproteasa PT4 recombinante, es una alternativa para su uso en diversas industrias, principalmente agropecuaria, alimentaria, farmacéutica, médica, cosmética para la obtención de productos con alto valor agregado, como hidrolizados proteicos o péptidos con propiedades funcionales o nutracéuticas a partir de proteínas obtenidas de diferentes fuentes alimentarias de origen vegetal y animal, así como de residuos agroindustriales, pecuarios, pesqueros, entre otros. En este último aspecto, se pueden aprovechar los residuos que contaminan el ambiente para la generación de productos de alto valor e incentivar la formación de industrias o sectores productivos que contribuyan al desarrollo socioeconómico.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- Se amplificó y clonó el gen de la exoproteasa PT4 de *Pseudomonas aeruginosa* M211 en *E.coli* DH5 $\alpha$ , cuya secuencia aminoacídica presentó 99,40 % de similitud con la elastasa B de *P. aeruginosa*.
- La caracterización la exoproteasa PT4 *in silico* indica una proteína madura de 301 aa, con un PM de 33,2 kDa, dependiente de zinc y calcio. Con un pI de 5.79.
- La exoproteasa PT4 recombinante es una metaloproteasa inhibida por ácido etilendiaminotetracético y zinc 10 mM, presenta actividad en un amplio rango de pH (5 y 10,5) y temperatura (20 °C a 100 °C); termoestabilidad hasta 50 °C por 24 h.
- La exoproteasa PT4 recombinante hidrolizó concentrados proteicos de *Erythrina edulis*, *Phaseolus lunatus*, y *Lupinus mutabilis*; y en placas caseína y gelatina, demostrando su aplicabilidad en la hidrólisis de proteínas de origen vegetal y animal.

## CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;60(4):381–95.
2. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande V V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1998;62(3):597–635. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/%5Chttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/pdf/mr000597.pdf>
3. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016;6(2):1–15.
4. Sawant R, Nagendran S. Protease : an Enzyme With Multiple Industrial Applications. *World J Pharm Pharm Sci*. 2014;3(6):568–79.
5. Alejandro-Paredes L, Flores-Fernández CN, Zavaleta AI. OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR EXTRACELLULAR PROTEASES PRODUCTION BY *Pseudomonas* sp . *Rev Soc Quím Perú*. 2017;83(4):449–62.
6. Flores-Fernández CN, Cárdenas-Fernández M, Dobrijevic D, Jurlewicz K, Zavaleta AI, Ward JM, et al. Novel extremophilic proteases from *Pseudomonas aeruginosa* M211 and their application in the hydrolysis of dried distiller's grain with solubles. *Biotechnol Prog*. 2019;35(1).
7. Al-Rubii BAL. Cloning LasB gene of *pseudomonas aeruginosa* elastase 10104-2aI in *E. coli* BL21 and *e. coli* DH5? and investigated their effect on the stripping of vero cells. *Pakistan J Biotechnol*. 2017;14(4):697–705.
8. Draper D. Cloning and Expression of *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase for Elucidating the Pathophysiological Effect on Lung Tissue. *Cloning*. 2017;
9. Zhu F, Zhuang Y, He B. [Cloning and expression of protease PT121 from *Pseudomonas aeruginosa* and application in peptide synthesis]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* [Internet]. 2015;55(1):67–72. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/25958684>
10. Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Janczarek M, Cytryńska M. Three *pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim Pol*.

2013;60(1):83–90.

11. Raftari M, Ghafourian S, Sadeghifard N, Abu Bakar F. Cloning and overexpression of extracellular elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Inflamm*. 2013;11(1):55–60.
12. Ghorbel-Bellaaj O, Hayet BK, Bayoudh A, Younes I, Hmidet N, Jellouli K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: Purification, characterization and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2012;50(3):679–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.038>
13. Thayer MM, Flaherty KM, McKay DB. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *J Biol Chem* [Internet]. 1991;266(5):2864–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1899664>
14. Gupta A, Ray S, Kapoor S, Khare SK. Solvent-stable *Pseudomonas aeruginosa* PseA protease gene: Identification, molecular characterization, phylogenetic and bioinformatic analysis to study reasons for solvent stability. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;15(4):234–43.
15. Golemi-kotra D. *Pseudomonas* infections. *xPharm Compr Pharmacol Ref*. 2008;1–8.
16. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. Vols. 2–3, *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Elsevier Ltd; 2014. 753–767 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>
17. Planet PJ. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. Fifth Edit. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier Inc.; 2017. 866–870 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00155-9>
18. Caballero AR, Moreau JM, Engel LS, Marquart ME, Hill JM, O’Callaghan RJ. *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV Enzyme Assays and Comparison to Other *Pseudomonas* Proteases. *Anal Biochem* [Internet]. 2001;290(2):330–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269701949991>
19. Hoge R, Pelzer a, Rosenau F, Wilhelm S. Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* [Internet]. 2010;45:383–95. Available from: <http://www.formatex.info/microbiology2/383-395.pdf>

20. Kharazmi A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Lett.* 1991;30(2):201–5.
21. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, et al. Microbial proteases applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(JUN):1–20.
22. Ali N, Ullah N, Qasim M, Rahman H, Khan SN, Sadiq A, et al. Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles.* 2016;20(4):395–402.
23. Kiranmayee R, M LN. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. *African J Biotechnol.* 2007;6(21):2493–6.
24. Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *J Genet Eng Biotechnol* [Internet]. 2017;15(1):115–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
25. Mienda BS, Yahya A, Galadima IA, Shamsir MS. An overview of microbial proteases for industrial applications. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2014;5(1):388–96.
26. Rani, Kirti, Rana, Rachita, Datt, Sanchi. Review on Latest Overview of Proteases. *Int J Curr Life Sci.* 2012;2(1):12–8.
27. Gupta R, Beg Q, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59(1):15–32.
28. Rawlings ND, Barrett AJ. Introduction: Metallopeptidases and Their Clans. Vol. 1, *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 2013. 325–370 p.
29. Mamo J, Assefa F. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. *J Food Qual.* 2018;2018.
30. Chang WJ, Horiuchi S, Takahashi K, Yamasaki M, Yamada Y. The structure and function of acid proteases. VI. effects of acid protease-specific inhibitors on the acid proteases from *Aspergillus Niger* var. *macrosporus*. *J Biochem.* 1976;80(5):975–81.
31. Theron LW, Divol B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(21):8853–68.
32. Sumantha A, Sandhya C, Szakacs G, Soccol CR, Pandey A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation.

- Food Technol Biotechnol. 2005;43(4):313–9.
33. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. J Mol Catal B Enzym [Internet]. 2013;90:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
  34. Yuzuki M, Matsushima K, Koyama Y. Expression of key hydrolases for soy sauce fermentation in *Zygosaccharomyces rouxii*. J Biosci Bioeng [Internet]. 2015;119(1):92–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.015>
  35. Umeadi C, Kandeel F, Al-Abdullah IH. Ulinastatin Is a Novel Protease Inhibitor and Neutral Protease Activator. Transplant Proc. 2008;40(2):387–9.
  36. Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature. 2005;438(7071):1157–61.
  37. Wang J, Xu A, Wan Y, Li Q. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001. Appl Biochem Biotechnol. 2013;170(8):2021–33.
  38. Zhou C, Qin H, Chen X, Zhang Y, Xue Y, Ma Y. A novel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry. Sci Rep [Internet]. 2018;8(1):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34416-5>
  39. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: A review. Bioresour Technol. 1998;64(3):175–83.
  40. Morihara K. Pseudolysin and Other Pathogen Endopeptidases of Thermolysin Family. Methods Enzymol. 1995;248(C):242–53.
  41. Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Ohman DE. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. J Biol Chem. 1998;273(46):30225–31.
  42. Bever RA, Iglewski BH. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. J Bacteriol. 1988;170(9):4309–14.
  43. Fukushima J, Yamamoto S, Orihara K, Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamoto S, et al. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. J Bacteriol. 1989;171(3):1698–704.
  44. Kessler E, Safrin M, Peretz M, Burstein Y. Identification of cleavage sites involved

- in proteolytic processing of *Pseudomonas aeruginosa* preproelastase. *FEBS Lett.* 1992;299(3):291–3.
45. McIver K, Kessler E, Ohman DE. Substitution of active-site His-223 in *Pseudomonas aeruginosa* elastase and expression of the mutated lasB alleles in *Escherichia coli* show evidence for autoproteolytic processing of proelastase. *J Bacteriol.* 1991;173(24):7781–9.
  46. KAZUYUKI MORIHARA, HIROSHIGE TSUZUKI, TATSUSHI OKA, HIDEO INOUE AME. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *J Biol CHEMISTRY.* 1965;240(8):3295–304.
  47. Ogino H, Yokoo J, Watanabe F, Ishikawa H. Cloning and sequencing of a gene of organic solvent-stable protease secreted from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and its expression in *Escherichia coli*. *Biochem Eng J.* 2000;5(3):191–200.
  48. Pham P V. Medical biotechnology: Techniques and applications. *Omi Technol Bio-engineering Toward Improv Qual Life.* 2018;1:449–69.
  49. Ehtisham M, Wani F, Wani I, Kaur P, Nissar S. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian J Contemp Dent.* 2016;4(2):30.
  50. Roberts MAJ. Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays Biochem.* 2019;63(4):457–68.
  51. Dehar N, Singh H. Polymerase chain reaction. *Asian J Chem.* 2006;18(5):3437–41.
  52. Das S, Dash HR. Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems. *Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems.* 2015.
  53. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463–7.
  54. Roberts MAJ. Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays Biochem.* 2019;63(4):457–68.
  55. Jingchao Chen, Yi Li, Kun Zhang HW. Whole-Genome Sequence of Phage-Resistant Strain *Escherichia coli* DH5alpha. *Am Soc Microbiol.* 2018;6(10):5–6.
  56. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5α-mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PLoS One.* 2015;10(9):1–15.



57. Scientific T. CloneJET PCR Cloning Kit. ThermoScientific. 2012;16.
58. Flores-Fernández CN, Cárdenas-Fernández M, Dobrijevic D, Jurlewicz K, Zavaleta AI, Ward JM, et al. Novel extremophilic proteases from *Pseudomonas aeruginosa* M211 and their application in the hydrolysis of dried distiller's grain with solubles. *Biotechnol Prog*. 2019;35(1).
59. Caballero A, Thibodeaux B, Marquart M, Traidej M, O'Callaghan R. *Pseudomonas* Keratitis: Protease IV Gene Conservation, Distribution, and Production Relative to Virulence and Other *Pseudomonas* Proteases. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(2):522–30.
60. Traidej M, Caballero AR, Marquart ME, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV expressed in *Pseudomonas putida*. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(1):190–6.
61. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557–80.
62. Lernmark A, Sehlin J, Täljedal IB, Kromann H, Nerup J. Possible toxic effects of normal and diabetic patient serum on pancreatic B-cells. *Diabetologia*. 1978;14(1):25–31.
63. Ish-Horowicz D, Burke JF. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res*. 1981;9(13):2989–2898.
64. Dilia Celeste Pérez-Reytor\* AESE. Evaluación de la tolerancia a la criopreservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *Vaccimonitor*. 2010;19(2):11–7.
65. Huang X, Madan A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program Resource 868 Genome Research. *Genome Res* [Internet]. 1999;(906):868–77. Available from: [www.genome.org](http://www.genome.org)
66. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403–10.
67. Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem Sci*. 1994;19(6):258–60.
68. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal

- peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8(10):785–6.
69. Chou PY, Fasman GD. Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry*. 1974;13(2):222–45.
  70. Chou PY, Pasman GD. Conformational Parameters for Amino Acids in Helical,  $\beta$ -Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry*. 1974;13(2):211–22.
  71. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. The Proteomics Protocols Handbook. *Proteomics Protoc Handb*. 2005;571–608.
  72. Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng Des Sel*. 1990;4(2):155–61.
  73. Côlho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E, Tambourgi EB. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
  74. Marion B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(3):248–54.
  75. Mesas JM, Gil JA, N JFM. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. 1990;3–7.
  76. Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Zavaleta AI, Arnao I, Peña C, Chávez-Hidalgo EL, et al. *Erythrina edulis* (pajuro) seed protein: A new source of antioxidant peptides. *Nat Prod Commun*. 2016;11(6):781–6.
  77. Betancur-Ancona D, Gallegos-Tintor S, Chel-Guerrero L. Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: Partial characterization of starch and protein. *J Sci Food Agric*. 2004;84(10):1193–201.
  78. LAEMMLI UK. © 1970 Nature Publishing Group. *Nat Publ Gr* [Internet]. 1970;228:726–34. Available from: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
  79. Tang YW, Sefers SE, Li H, Kohn DJ, Procop GW. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4830–3.

80. Wang F, Zhu Y, Huang Y, McAvoy S, Johnson WB, Cheung TH, et al. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. 2005;24(24):3875–85.
81. Fukushima J, Yamamoto S, Orihara K, Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamoto S, et al. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J Bacteriol*. 1989;171(3):1698–704.
82. Galdino ACM, Viganor L, De Castro AA, Da Cunha EFF, Mello TP, Mattos LM, et al. Disarming *Pseudomonas aeruginosa* virulence by the inhibitory action of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based compounds: Elastase B (lasB) as a chemotherapeutic target. *Front Microbiol*. 2019;10(JULY):1–16.
83. Özen AI, Ussery DW. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? *Microb Ecol*. 2012;63(2):239–48.
84. Kessler E, Ohman DE. Pseudolysin. *Handb Proteolytic Enzym*. 2013;1(Chapter 180):582–92.
85. Cornelis P. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr Opin Biotechnol*. 2000;11(5):450–4.
86. Blight MA, Holland IB. Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends Biotechnol*. 1994;12(11):450–5.
87. Nisole A, Lussier FX, Morley KL, Shareck F, Kazlauskas RJ, Dupont C, et al. Extracellular production of *Streptomyces lividans* acetyl xylan esterase A in *Escherichia coli* for rapid detection of activity. *Protein Expr Purif*. 2006;46(2):274–84.
88. Jang KH, Seo JW, Song KB, Kim CH, Rhee SK. Extracellular secretion of levansucrase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Bioprocess Eng*. 1999;21(5):453–8.
89. Lingala SM, Ghany MGMMhs. 毛细血管网来源的米色脂肪和它节老鼠的代谢内稳态 HHS Public Access. Vol. 25. 2016. 289–313 p.
90. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*. 2015;14(1):1–10.
91. Tanaka E, Kawamoto S, Fukushima J, Hamajima K, Onishi H, Miyagi Y, et al.

- Detection of elastase production in *Escherichia coli* with the elastase structural gene from several non-elastase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1991;173(19):6153–8.
92. Gupta A, Roy I, Khare SK, Gupta MN. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J Chromatogr A.* 2005;1069(2):155–61.
  93. Marquart ME, Caballero AR, Chomnawang M, Thibodeaux BA, Twining SS, O’Callaghan RJ. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(10):3761–8.
  94. Lomholt JA, Poulsen K, Kilian M. Epidemic Population Structure of. *Infect Immun.* 2001;69(10):6284–95.
  95. Hummel KM, Penheiter AR, Gathman AC, Lilly WW. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. *Anal Biochem.* 1996;233(1):140–2.
  96. Jellouli K, Bayoudh A, Manni L, Agrebi R, Nasri M. Purification, biochemical and molecular characterization of a metalloprotease from *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on shrimp wastes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79(6):989–99.
  97. Tang XY, Wu B, Ying HJ, He BF. Biochemical properties and potential applications of a solvent-stable protease from the high-yield protease producer *pseudomonas aeruginosa* PT121. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;160(4):1017–31.
  98. Cheng M, Takenaka S, Aoki S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2009;107(4):373–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.010>
  99. Han M, Wang X, Ding H, Jin M, Yu L, Wang J, et al. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2014;54(1):32–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.09.014>
  100. Kocabiyik S, Ergin E, Turkoglu S. Effects of metals on elastase from *Pseudomonas aeruginosa* SES-938-1. *Biol Trace Elem Res.* 1995;50(1):25–31.

101. Kessler E, Kennah HE, Brown SI. Pseudomonas protease. Purification, partial characterization, and its effect on collagen, proteoglycan, and rabbit corneas. InvestOphthalVisual Sci. 1977;16(6):488–97.
102. Auld DS1. Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. Methods Enzymol. 1995;248(C):228–42.
103. Larsen KS, Auld DS. Characterization of an Inhibitory Metal Binding Site in Carboxypeptidase A. Biochemistry. 1991;30(10):2613–8.
104. Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. Caries Res. 2012;46(3):201–7.
105. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, et al. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. J Dent [Internet]. 2011;39(2):148–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.11.005>
106. Borja-Lozano Jackelyne Elena. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE *Lupinus mutabilis* (" tarwi ") MEDIANTE PROTEASAS DE *Bacillus* sp . Univ Nac Mayor San Marcos- Fac Farm y Bioquim. 2014;1–106.
107. Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Zavaleta AI, Hernández-Ledesma B. Production of antioxidant hydrolyzates from a *lupinus mutabilis* (Tarwi) protein concentrate with alcalase: Optimization by response surface methodology. Nat Prod Commun. 2018;13(6):751–6.
108. El Nasri NA, El Tinay AH. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. Food Chem. 2007;103(2):582–9.
109. Vioque J, Millán F. Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. Agroscic [Internet]. 2005;(January 2005):2–8. Available from: <http://hdl.handle.net/10261/5750>
110. Santos CN, Ferreira RB, Teixeira AR. Seed Proteins of *Lupinus mutabilis*. J Agric Food Chem. 1997;45(10):3821–5.
111. Polanco-Lugo E, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona DA, Chel-Guerrero LA. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. Food Sci Technol. 2014;34(3):441–8.

112. Cumby N, Zhong Y, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.* 2008;109(1):144–8.
113. Pazinato C, Malta LG, Pastore GM, Netto FM. Antioxidant capacity of amaranth products: Effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Sci Technol.* 2013;33(3):485–93.
114. Ranamukhaarachchi S, Meissner L, Moresoli C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *J Memb Sci* [Internet]. 2013;429:81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.040>
115. Magaña MD, Segura-Campos M, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. ACE-I inhibitory properties of hydrolysates from germinated and ungerminated *Phaseolus lunatus* proteins. *Food Sci Technol.* 2015;35(1):167–74.
116. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008;48(5):430–41.
117. Sbroggio MF, Montilha MS, Figueiredo VRG de, Georgetti SR, Kurozawa LE. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Sci Technol.* 2016;36(2):375–81.
118. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 1999;17(7):561–94.
119. Shu G, Zhang Q, Chen H, Wan H, Li H. Effect Of Five Proteases Including Alcalase, Flavourzyme, Papain, Proteinase K And Trypsin On Antioxidative Activities Of Casein Hydrolysate From Goat Milk. *Acta Univ Cibiniensis Ser E Food Technol.* 2018;19(2):65–74.
120. Segura-Campos M, Ruiz-Ruiz J, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Antioxidant activity of *Vigna unguiculata* L. wulp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. *CYTA - J Food.* 2013;11(3):208–15.
121. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT - Food Sci Technol.* 2009;42(10):1597–604.
122. Boschini G, Scigliuolo GM, Resta D, Arnoldi A. ACE-inhibitory activity of

- enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. Food Chem [Internet]. 2014;145:34–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.076>
123. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Protein hydrolysates: processes and applications Palabras clave: hidrólisis enzimática \* proteínas \* proteasas \* caracteriza- ción \* grado de hidrólisis. Acta Bioquím Clín Latinoam [Internet]. 2008;42(2):227–36. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>
  124. Ruiz-López MA, Barrientos-Ramírez L, García-López PM, Valdés-Miramontes EH, Zamora-Natera JF, Rodríguez-Macias R, et al. Nutritional and bioactive compounds in mexican lupin beans species: A mini-review. Nutrients. 2019;11(8).
  125. Ximénez-Embún P, Rodríguez-Sanz B, Madrid-Albarrán Y, Cámara C. Uptake of heavy metals by lupin plants in artificially contaminated sand: Preliminary results. Int J Environ Anal Chem. 2002;82(11–12):805–13.
  126. Peñalosa JM, Carpena RO, Vázquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, et al. Chelate-assisted phytoextraction of heavy metals in a soil contaminated with a pyritic sludge. Sci Total Environ. 2007;378(1–2):199–204.
  127. Trejo N, Matus I, del Pozo A, Walter I, Hirzel J. Cadmium phytoextraction capacity of white lupine (*Lupinus albus* L.) and narrow-leafed lupine (*Lupinus angustifolius* L.) in three contrasting agroclimatic conditions of Chile. Chil J Agric Res. 2016;76(2):228–35.
  128. Lambers H, Clements JC, Nelson MN. How aphosphorus-acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of lupines (*Lupinus*, Fabaceae). Am J Bot. 2013;100(2):263–88.
  129. Evangelho JA do, Vanier NL, Pinto VZ, Berrios JJD, Dias ARG, Zavareze E da R. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. Food Chem [Internet]. 2017;214:460–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.046>
  130. Zhao G, Liu Y, Zhao M, Ren J, Yang B. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. Food Chem [Internet]. 2011;127(4):1438–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.046>

131. Guerra-Almonacid CM, Torruco-Uco JG, Murillo-Arango W, Méndez-Arteaga JJ, Rodríguez-Miranda J. Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates J Food Agric*. 2019;31(4):288–96.
132. Herrera-Ponce AL, Alarcón-Rojo AD, Salmeron I, Rodríguez-Figueroa JC. Physiological health effects of whey protein-derived bioactive peptides: A review. *Rev Chil Nutr*. 2019;46(2):205–14.